

ÜBER ANALYTIK UND METABOLISMUS VON
5-PHENYL-1,4-BENZODIAZEPINDERIVATEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Sadée

aus Bad Harzburg

1968

ÜBER ANALYTIK UND METABOLISMUS VON
5-PHENYL-1,4-BENZODIAZEPINDERIVATEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Sadée

aus Bad Harzburg



Erster Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schenck

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 3.7.68

Tag der Promotion:

15. JULI 1968

Meinen Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr.G.Schenck und Herrn Oberchemierat Dr.K.-H.Beyer am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin und an der Landesanstalt für Lebensmittel-, Arzneimittel- und gerichtliche Chemie durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof.Dr.Schenck, danke ich für das mir entgegengebrachte Interesse und die wohlwollende Unterstützung und Förderung meiner Arbeit. Herrn Oberchemierat Dr.Beyer schulde ich besonderen Dank für die fruchtbaren Anregungen und die fortwährende Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

A. BINLEITUNG

A I.	Geschichtliches		1
A II.	Struktur und Nomenklatur		2
A III.	Pharmakologie		4
A IV.	Aufgabenstellung		6

B. ANALYTIK DER BENZODIAZEPINE

B I.	Literaturübersicht		7
B II.	Titration in nichtwässrigem Medium		9
1.	Allgemeines		9
2.	Potentiometrische Endpunktbestimmung		11
3.	Visuelle Endpunktbestimmung		16
4.	Titration von Arzneimittelnzubereitungen	..	17
B III.	Farbreaktion nach Bratton-Marshall		19
1.	Allgemeines		19
2.	Einfluss verschiedener Faktoren		21
3.	Extraktionsbedingungen		23
4.	Eichkurven und Diskussion		25
B IV.	Kernmagnetische Protonenresonanz		28

C. METABOLISMUS DER BENZODIAZEPINE

C I.	Literaturübersicht		40
C II.	Synthese möglicher Nitrazepam-Metaboliten	.	43
C III.	Analytik der Modells-substanzen		52
1.	UV-Spektren		52
2.	IR-Spektren		54
3.	Bratton-Marshall-Reaktion einiger Modell-substanzen		55
4.	Dünnschichtchromatographie		57
5.	Extraktionsverfahren		60
C IV.	Untersuchungen an Harnproben		61
1.	Voruntersuchungen mit Hilfe der Papier-chromatographie		61

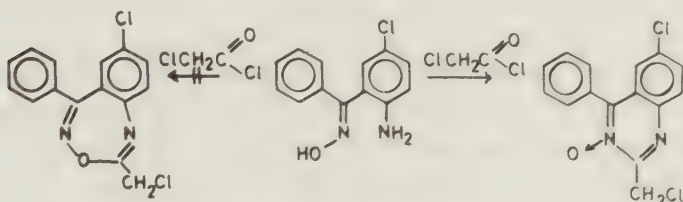
2.	Nachweis der Metaboliten 7-Amino-, 7-Acetamido-nitrazepam und 2-Amino- 5-nitro-benzophenon	62
3.	Nachweis von unverändertem Nitrazepam und dem Metaboliten 7-Amino-3-hydroxy- nitrazepam	70
4.	Nachweis polarer Konjugate	73
5.	Zusammenfassung der Untersuchungen über den Nitrazepam-Metabolismus	79
D.	<u>PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG</u>	82
D I.	Analytische Daten in Monographien	82
1.	Chlordiazepoxid	82
2.	Diazepam	83
3.	Nitrazepam	84
4.	Oxazepam	85
D II.	Messtechnische Daten	87
D III.	Titration in nichtwässrigem Medium (zu B II)	88
D IV.	Farbreaktion nach Bratton-Marshall (zu B III)	90
D V.	Kernmagnetische Protonenresonanz (zu B IV)	91
D VI.	Synthese möglicher Nitrazepam-Metaboliten... (zu C II)	94
D VII.	Bratton-Marshall-Reaktion einiger Modell- substanzen (zu C III,3)	100
D VIII.	Dünnschichtchromatographie (zu C III,4)	101
D IX.	Extraktionsverfahren (zu C III,5)	102
D X.	Verwendete Harnproben	103
D XI.	Papierchromatographie (zu C IV,1)	104
D XII.	Aufbereitung der Harnproben zur Herstellung von UV-Spektren (zu C IV,2 und 3)	104
D XIII.	Fermentative Aufarbeitung (zu C IV,4)	106
E.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	107

A EINLEITUNG

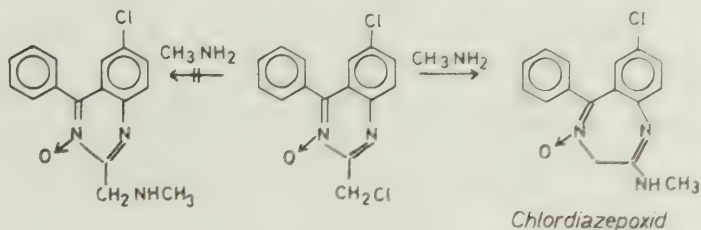
A I GESCHICHTLICHES

Die Synthese des Chlordiazepoxids erfolgte 1959 über zwei unerwartete Reaktionen :

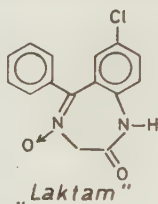
Bei der Umsetzung von 2-Amino-5-chlor-benzophenonoxim mit Chloracetylchlorid erhält man eine Substanz, die analog anderen Verbindungen als 3,1,4-Benzoxadiazepin bezeichnet wurde. Sternbach u.Litarb.(1,2) bewiesen jedoch, dass der Verbindung die Struktur eines Chinazolin-3-oxids zukommt. Ein Ringschluss ähnlicher Art ist schon früher beschrieben worden (3).



Bei der weiteren Umsetzung mit Methylamin bleibt das Chinazolingerüst nicht erhalten, sondern es entsteht unter Ringweiterung mit 50%-iger Ausbeute das Benzodiazepinderivat Chlordiazepoxid, dessen Struktur Sternbach u.Mitarb.(4) aufklärten.



Die interessantesten pharmakologischen Eigenschaften der Chlordiazepoxids veranlassten genauere Untersuchungen dieser Stoffklasse. Der von Koechlin und Mitarb.(5) gefundene Metabolit, das "Laktam" des Chlordiazepoxids, erwies sich ebenfalls als pharmakologisch aktiv, so dass zahlreiche Derivate vom Typ des 1,4-Benzodiazepin-2-ons synthetisiert wurden.



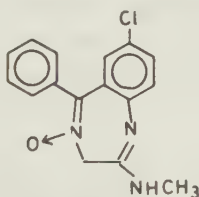
Man konnte feststellen, dass hier die N-Oxid-Struktur die Wirkung eher abschwächt, so dass sich das Interesse auf die Desoxyderivate verlagerte. Aus dieser Reihe werden in Deutschland bisher Diazepam, Nitrazepam und Oxazepam therapeutisch verwendet. Weitere Derivate sind in klinischer Prüfung.

A II Struktur und Nomenklatur

Die Benzodiazepine lassen sich in zwei Untergruppen einteilen :

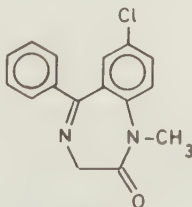
-
- (1) L.H.Sternbach, S.Kaiser u.E.Reeder, J.Am.Chem.Soc. 82, 475 (1960)
 - (2) L.H.Sternbach, L.O.Randall u.S.R.Gustafson, in Psychopharmacological Agents, M.Gordon, Academic Press N.Y./London, 1964, S. 137 - 224
 - (3) E.Schmitz, Angew.Chem. 69, 728 (1957)
 - (4) L.H.Sternbach u.E.Reeder, J.Organ.Chem. 26, 1111 (1961)
 - (5) B.A.Koechlin u.L.D'Arconte, Analyt.Biochem. 5, 195 (1963)
 - (6) M.Neiger, Organisch chemische Arzneimittel und ihre Synonyma, 3.neubearb.Aufl., Akademie-Verlag Berlin, 1967

1. 2-Amino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine
 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxid
 INN : Chlordiazepoxid (anfangs unter Methamindiazepoxid bekannt)
 Handelsname : Librium^R
 (Firma Hoffmann-La Roche)
 weitere Handelsnamen s. (6)



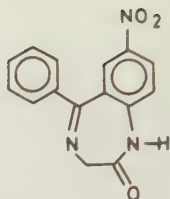
Chlordiazepoxid

2. 1,3-Dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one
 - a. 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on
 INN : Diazepam
 Handelsname : Valium^R
 (Firma Hoffmann-La Roche)
 weitere Handelsnamen s. (6)



Diazepam

- b. 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on
 INN : Nitrazepam vorgeschlagen
 Handelsname : Mogadan^R
 (Firma Hoffmann-La Roche)
 weitere Handelsnamen s. (6)



Nitrazepam

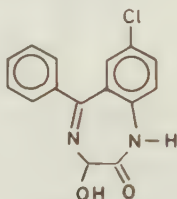
c. 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on

INN : Oxazepam

Handelsname : Adumbran^R

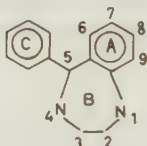
(Firma Dr.K.Thomae GmbH)

weitere handelsnamen s.(6)



Oxazepam

Die Nomenklatur ergibt sich nach folgender Zählweise :



A IIII Pharmakologie

Die Kombination dreier Wirkungskomponenten macht die Benzodiazepine für eine Reihe von Indikationen interessant. Im Vordergrund stehen die Wirkung als Tranquillizer (7,8,9), als Muskelrelaxans (8,9,10,11) und als Antikonvulsivum (9-14). Hinzu kommen eine anxiolytische Wirkung (9,10,13,15) und ein zähmender Einfluss auf Tiere ("taming effect") (11,12,16,17), der die

Benzodiazepine von anderen Tranquilizern wie Me-
probamat und Chlorpromazin abgrenzt (15).

Durch den spezifischen Angriffspunkt im limbischen
System, das die emotionale Lage beeinflusst (18),
werden vor allem Chlordiazepoxid, Oxazepam und
Diazepam als Antidepressiva und Tranquilizer einge-
setzt. Beim Diazepam tritt, bedingt durch N₁-Methy-
lierung (19), die muskelrelaxierende Wirkung stär-
ker hervor, so dass es unter anderem in der Gynä-
kologie je nach Dosis bei der normalen Geburt oder
zur Unterdrückung der Wehentätigkeit bei drohender
Frühgeburt verwendet wird (20).

Die Wirkung ist allgemein dosisabhängig (15) : so
findet man bereits bei sehr niedrigen Dosierungen
(z.B. 10-30 mg Oxazepam) einen anxiolytischen Effekt,
bei höherer Dosierung eine Sedierung oder manchmal
auch Stimulierung (Steigerung des Wohlbefindens,
Interesse an der Umwelt, Appetitssteigerung) (7,10,
21,22). Erst bei starker Medikation tritt die muskel-
relaxierende und antikonvulsive Wirkung auf und bei
hoher Überdosierung Trägheit und Ataxie als Neben-
effekte, vor allem beim Diazepam (15,19).

Von Bedeutung für die Wirkung ist eine stark elektro-
negative Substitution in 7-Stellung. (NO₂>Cl>H) (19).

-
- (7) J. Wahrenberg u. G. Prystav, *Arzneim.-Forsch.* 16, 754 (1966)
 - (8) H. Gross u. E. Laner, *Arzneim.-Forsch.* 16, 1328 (1966)
 - (9) T. H. Harris, *J. Am. Med. Assn.* 172, 1162 (1960)
 - (10) L. O. Randall, C. L. Checkel u. R. F. Banzinger, *Curr. Ther.*
Res. 7, 590 (1965)
 - (11) L. O. Randall, W. Schallek, C. L. Checkel, R. E. Bagdon u.
J. Rieder, *Schweiz. med. Wschr.* 95, 334 (1965)
 - (12) H. Klupp u. J. Köhling, *Arzneim.-Forsch.* 15, 359 (1965)
 - (13) M. J. Gluckman, *Curr. Ther. Res.* 7, 721 (1965)
 - (14) T. H. Jong, *Schweiz. med. Wschr.* 94, 730 (1964)

So ist Nitrazepam das einzige Antikonvulsivum, das bereits in Mengen von wenigen mg wirksam ist (25-30 mg) (14), ein häufig benutztes Additions-therapeuticum bei fast allen Fällen der Epilepsie. In Europa wurde es auf Grund seiner sedierenden Wirkung vor allem als Schlafmittel eingeführt. Durch selektive Dämpfung des "limbischen Systems", des emotionellen Afferenzgebietes des Wachregulationssystems, wird die Schlafbereitschaft erhöht (11). Man spricht von einer hypnogenen Wirkung (23) im Gegensatz zur hypnotischen Wirkung durch unspezifische allgemeine Sedierung aller Gebiete des Zentralnervensystems. Muñoz prägte den Begriff "Euhypnotica" (24), für die keine strenge Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht.

Die Benzodiazepine besitzen eine hohe therapeutische Breite, Nebenwirkungen oder Gewöhnung werden selten beobachtet.

A IV Aufgabenstellung

Die vier Benzodiazepine sollten mit analytischen

-
- (15) J.M.Tobin u.N.C.D.Lewis, J.Am.Med.Assn. 174,1242(1960)
 - (16) L.O.Randall, G.A.Heise, W.Schallek, R.E.Bagdon, R.Banzinger, A.Boris, R.A.Moe u.W.B.Abrams, Curr.Ther.Res. 3,405(1961)
 - (17) G.A.Heise u.E.Boff, Fed.Proc. 20,393(1961)
 - (18) W.Schallek u.A.Kühn, Proc.Soc.Exp.Biol. 105,115(1960)
 - (19) S.J.Childress u.M.J.Gluckman, J.Pharm.Sci. 53,577(1964)
 - (20) M.Berger u.W.Neuweiler, Geburts-u.Frauenheilkunde 22,1275(1962)
 - (21) H.Gross, H.Hackl u.E.Langner, Arzneim.-Forsch. 16,1323(1966)
 - (22) L.O.Randall, W.Schallek, G.A.Heise, E.F.Keith u. R.E.Bagdon, J.Pharm.Exp.Ther. 129,163(1960)

Methoden charakterisiert und differenziert werden, z.B. auf Grund des Extraktionsverhaltens, der UV-, IR- und N.M.R.-Spektren, der Basizitäten und der chemischen Stabilität. Mit den erhaltenen Daten sollte versucht werden, quantitative Bestimmungsmethoden auszuarbeiten, auch für toxikologische Analysen aus biologischem Material. Hierzu war der Metabolismus vor allem des Nitrazepam zu untersuchen.

B ANALYTIK DER BENZOLIAZEPINE

=====

B I Literaturübersicht

Eine Reihe von Autoren haben ein oder mehrere Benzodiazepine bereits in toxikologische Trennungsgänge mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (25-28) und Gaschromatographie (29) einbezogen. Mit der Dünnschichtchromatographie der Benzodiazepine selbst und ihrer Hydrolyseprodukte befassten sich folgende Autoren: Beyer (30,31), Oelschläger (32) und Langner (33). Lie bei saurer Hydrolyse entstehenden Benzophenonderivate können auf Grund ihres niedrigen Schmelzpunktes mit Hilfe der Gas-Liquid-Chromatographie bestimmt werden. (34-37)

Lie freie aromatische Amino-Gruppe der 2-Amino-benzophenone nutzten einige Autoren (38-44) für Farbreaktionen zu Diazofarbstoffen. Oelschläger u. Mitarb. (45-49), Cimbura (50) u. Senkowski (51) wendeten polarographische Methoden an.

(23) J. Wyss u. A. Mäder, Schweiz. Med. Wschr. 95, 338 (1965)

(24) J. G. Muñoz u. A. Levitas, Arzneim.-Forsch. 15, 1118 (1965)

(25) I. Sunshine, Am. J. Clin. Pathol. 40, 576 (1963)

Für Oxazepam gaben Walkenstein und Mitarb. (38) eine fluorimetrische Bestimmung an. Bei milder Hydrolyse von Chlordiazepoxid liessen sich das entstehende Methylamin nach Rubin (52) mit Dinitrofluorbenzol und das "Laktam" fluorimetrisch in NaOH nach Photoisomerisation zum Oxaziranderivat bestim-

-
- (26) W. Paulus, W. Hoch u. R. Keymer, *Arzneim.-Forsch.* 13, 609 (1963)
 - (27) S. El Gendi, W. Kisser u. C. Machata, *Microchim. Techno-acta* 1965, 1, 120
 - (28) K. Macek u. J. Vecerkova, *Pharmazie* 20, 605 (1965)
 - (29) L. Kazyak u. E. C. Knoblock, *Analyt. Chem.* 35, 1448 (1963)
 - (30) K.-H. Beyer, *Dtsch. Apoth.-Ztg.* 105, 1529 (1965)
 - (31) K.-H. Beyer, Vortrag am 2. Euro. Kong. d. Zentren z. Bekämpf. v. Vergiftgn., 19.8.1966, Kopenhagen
 - (32) H. Oelschläger, *Pharmaz. Ztg.* 110, 608 (1965)
 - (33) H. J. Langner, *Z. analyt. Chem.* 202, 28 (1964)
 - (34) J. A. F. de Silva u. J. Kaplan, *J. Pharm. Sci.* 55, 1278 (1966)
 - (35) J. A. F. de Silva, E. A. Schwartz, V. Stefanovic, J. Kaplan u. L. D'Arconte, *Anal. Chem.* 36, 2099 (1964)
 - (36) H. J. A. ersborg u. K. R. uellius, unveröffentlicht
 - (37) J. A. F. de Silva, E. A. Schwartz, V. Stefanovic, J. Kaplan, L. D'Arconte u. E. Postma, *Fed. Proc.* 23, 493 (1964)
 - (38) S. S. Walkenstein, R. Wiser, C. H. Gudmundsen, H. D. Kimmel u. R. A. Corradino, *J. Pharm. Sci.* 53, 1181 (1964)
 - (39) J. Bäumler u. S. Rippstein, *Helv. Chim. Acta* 44, 2208 (1961)
 - (40) Kuniaki Tokunaga, *Kagaku Keisatsu Kenkyusho Hokoku*, 17, 103 (1964)
 - (41) O. Pribilla, *Arzneim.-Forsch.* 14, 723 (1964)
 - (42) J. Rieder, *Arzneim.-Forsch.* 15, 1134 (1965)
 - (43) O. Pribilla, *Arzneim.-Forsch.* 15, 1148 (1965)
 - (44) H. Oelschläger, J. Volke, B. T. Lim u. U. Frank, *Arzneim.-Forsch.* 16, 82 (1966)
 - (45) H. Oelschläger, *Arch. Pharmaz.* 296, 396 (1963)
 - (46) H. Oelschläger, J. Volke u. E. Kurek, *Arch. Pharmaz.* 297, 431 (1964)
 - (47) H. Oelschläger, J. Volke, H. Hoffmann u. E. Kurek, *Arch. Pharmaz.* 300, 250 (1967)
 - (48) H. Oelschläger, *Dtsch. Apoth.-Ztg.* 105, 1527 (1965)
 - (49) H. Oelschläger u. H. Hoffmann, *Arch. Pharmaz.* 300, 817 (1967)
 - (50) T. Cimbura u. R. C. Gupta, *J. Forensic Sci.* 10, 282 (1965)
 - (51) B. Z. Senkowski, M. S. Levin, J. R. Urbigkeit u. E. G. Wollish, *Analyt. Chem.* 36, 1991 (1964)

men (5). Viele der genannten Autoren gaben UV-spektrophotometrische Methoden an (s.auch 53). Leal und Inacio (54) und Beral und Mitarb. (55) titrierten Chlordiazepoxid, sowie Alves (56) Diazepam in wasserfreiem Medium mit Perchlorsäurelösung.

B II Titration in nichtwässrigem Medium =====

1. Allgemeines

Zur Erfassung von schwachen, im wässrigen Milieu nicht mehr alkalimetrisch titrierbaren Basen ($pK_B > 6$) wird in zunehmendem Masse die Titration in nichtwässrigem Medium herangezogen. Häufig wird mit Perchlorsäure in Eisessig als Titrierflüssigkeit und Eisessig als Lösungsmittel gearbeitet, z.T. mit Zusätzen aprotischer Lösungsmittel wie Benzol (57). Über Methodik und Theorie hat u.a. Riddick in mehreren Arbeiten berichtet. (58-62)

Titration in nichtwässrigem Medium sind bereits in mehreren Pharmakopöen berücksichtigt, während in den Monographie-Entwürfen für das DAB 7 bisher lediglich die Bestimmung von Aminopyrin mit Perchlorsäure in Eisessig vorgesehen ist. Über die Titration weiterer Pharmazeutika berichteten u.a. Rink und Mitarb. (63, 64) und Bräuninger u. Honerjäger (65).

(52) D.T.Dubin, J.Biol.Chem. 235, 783 (1960)

(53) L.P.Rodrigues u.M.A.P.Alves, Rev.port.farm. 15, 309 (1965)

(54) A.M.Leal u.M.M.L.Inacio, Rev.port.farm. 12, 338 (1962)

(55) H.Beral, J.Calafeteanu, E.Tumil-Trescu u.P.Grintescu, Rev.Chim. (Bucuresti) 6, 169 (1965)

(56) M.A.P.Alves, Rev.port.farm. 13, 486 (1963)

Die amphiprotische Essigsäure besitzt als Lösungsmittel zwei Nachteile (66) : 1. Sie wirkt nivellierend auf unterschiedliche Basizitäten stärkerer Basen, so dass eine simultane Bestimmung meist nicht möglich ist. 2. Sehr schwache Basen (pK_B (in Wasser) > 12) lassen sich nicht mehr ohne weiteres bestimmen.

Weiterhin stören grössere Temperaturschwankungen, da der thermische Ausdehnungskoeffizient der Essigsäure fünfmal grösser als der des Wassers ist ($0,0011/^\circ$), so dass ein Korrekturfaktor eingeführt werden muss ($0,11\%/^\circ$) (67).

Sehr schwache Basen können z.B. mit Essigsäureanhydrid als Lösungsmittel erfasst werden (pK_B (in Wasser) < 15) (68), während die Variation der Masslösung im Allgemeinen keine Vorteile bringt. (69)

In diesem Lösungsmittel können noch Hydrohalogenide organischer Stickstoffbasen direkt bestimmt werden, die jedoch nach Zusatz einer Hg-II-acetat-Lösung auch in Eisessig titrierbar sind (70).

Die vier Benzodiazepinderivate bieten sich zur Titration im nichtwässrigen Medium an : der 7-Ring enthält zwei N-Atome in Stellung 1 und 4, Chloro-diazepoxid

-
- (57) B. Lang u. L. Tavaszy, Z. analyt. Chem. 158, 339 (1957)
 - (58) J. A. Riddick, Analyt. Chem. 24, 41 (1952)
 - (59) J. A. Riddick, Analyt. Chem. 26, 77 (1954)
 - (60) J. A. Riddick, Analyt. Chem. 28, 679 (1956)
 - (61) J. A. Riddick, Analyt. Chem. 30, 793 (1958)
 - (62) J. A. Riddick, Analyt. Chem. 32, 172 R (1960)
 - (63) W. Rink, R. Lux u. M. Riemhofer, Pharmaz. Ztg. 104, 1380 (1959)
 - (64) M. Rink u. R. Lux, Dtsch. Apoth.-Ztg. 101, 911 (1961)
 - (65) H. Bräuninger u. L. Honerjäger, Pharmazie 12, 382 (1957)

ein weiteres N-Atom ausserhalb des Ringes am C₂.

Titrationmethoden für Chlordiazepoxid wurden schon von Leal u. Inacio (54) (Methode für das Hydrochlorid : $O,1n-HClO_4$ in Eisessig mit Zusatz von Hg-II-acetat gegen Methylviolett) und Beral und Mitarb. (55) (Methode für die Base : $O,1n-HClO_4$ in Dioxan gegen Methylrot) ausgearbeitet. Alves (56) bestimmte Diazepam mit $O,1n-HClO_4$ in Eisessig/Essigsäureanhydrid gegen Kristallviolett als Indikator. Hier sollte versucht werden, eine Methode für die vier vorliegenden Benzodiazepine auszuarbeiten und an Hand des unterschiedlichen analytischen Verhaltens Aussagen z.B. über die relativen Basizitäten zu erhalten.

2. Potentiometrische Endpunktbestimmung

Es zeigte sich, dass alle vier Benzodiazepine bei der Titration mit Perchlorsäure in Eisessig wie einsäurige Basen reagieren, Chlordiazepoxid-Hydrochlorid jedoch so gut wie keine basischen Eigenschaften aufweist. Erst nach Zusatz von Hg-II-acetat gelang auch die Titration des Hydrochlorids als einsäurige Base (Abb.1)

Aus dem potentiometrischen Kurvenverlauf (Abb.1 und 2) liess sich die relative Basenstärke an Hand der Steilheit der Kurven im Äquivalenzpunkt ansehen. Die Werte

-
- (66) W. Huber, Methoden der Analyse in der Chemie, Bd. 1, Titrationen in nichtwässrigen Lösungsmitteln, Akad. Verlagsgesell., Fra./M., 1964
 - (67) V. Keller u. F. Weiss, Pharmazie 12, 462 (1957)
 - (68) R. Reiss, Z. Analyt. Chem. 167, 16 (1959)
 - (69) H. Weltkamp, Dtsch. Apoth.-Ztg. 101, 207 (1961)
 - (70) L. Pifer u. E. Gollish, Analyt. Chem. 24, 300 (1952)

sind nur bedingt auf wässriges Medium übertragbar (66).

Die Reihenfolge lautete mit steigender Basizität : Oxazepam << Nitrazepam < Diazepam << Chlordiazepoxid. Die Titrationskurve von Oxazepam wies zwei ausgeprägte Wendepunkte auf, die bei der Titration schwacher Basen mit starken Säuren auftreten. Der 1. Wendepunkt, d.h. ein Potentialsprung zum Beginn der Titration, verschwindet langsam über Nitrazepam und Diazepam zum Chlordiazepoxid hin. Trotz der grossen Unterschiede der Basizitäten war eine simultane Bestimmung von Chlordiazepoxid neben Oxazepam in Eisessig nicht möglich. Der Protonenangriff erfolgt beim Chlordiazepoxid an der Methylamindergruppe am C₂. Bei den anderen Substanzen stellt das N₄-Atom die basische Stelle des Moleküls dar, während das freie Elektronenpaar am N₁ durch die C=O-Funktion und den benachbarten Phenylring stark delokalisiert ist. Schon das Hydrolyseprodukt 2-Amino-5-chlor-benzophenon liess sich titrimetrisch mit Perchlorsäure in Eisessig kaum noch erfassen (Abb.2). Das "Laktam" des Chlordiazepoxids (5) reagierte auf Grund der Blockierung des N₄-Atoms durch die N₄-Oxid-Funktion nicht mehr basisch.

Die potentiometrischen Titrationskurven verliefen symmetrisch, so dass zur Äquivalenzpunktbestimmung die Wendepunktmethode benutzt werden konnte (66). Um die Potentialsprünge vor allem beim Oxazepam zu verbessern und eine visuelle Endpunktbestimmung mit Indikatoren zu ermöglichen, wurde das Verhalten verschiedener Lösungsmittel geprüft.

a. Ein Zusatz der gleichen Menge Dioxan zur Lösung von Oxazepam in Eisessig verbesserte den Potentialsprung nur geringfügig (Abb.3). Eine Lösung von Oxazepam in reinem Dioxan liess sich nicht titrieren.

b. Das Gemisch Chloroform/Eisessig = 1/1 wirkte sich beim Diazepam und Oxazepam abschwächend auf den Kurvenverlauf aus, während bei Nitrazepam durch Ausfal-

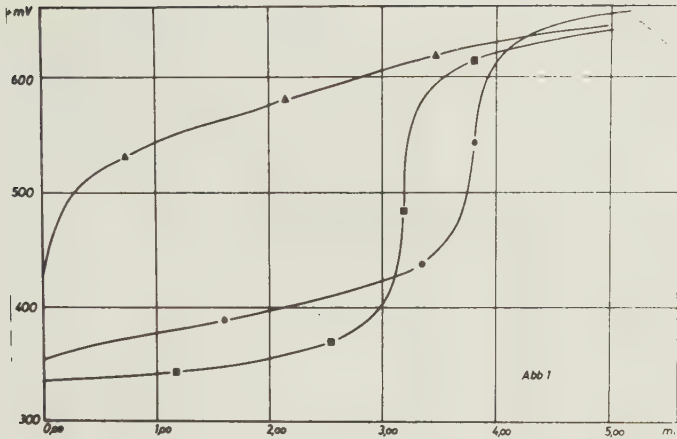


Abb. 1 : Titration mit 0,05n-HClO₄

- a. ▲ Chlordiazepoxid . HCl in Eisessig
- b. ■ Chlordiazepoxid . HCl in Eisessig mit Hg-II-acetat
- c. ● Diazepam in Eisessig

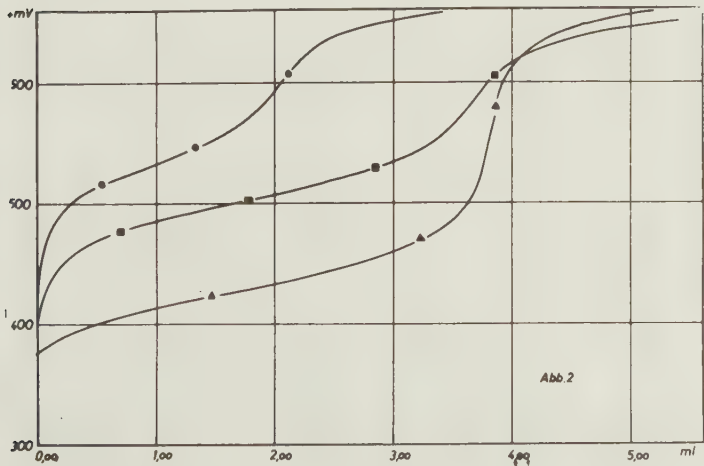


Abb. 2 : Titration mit 0,05n-HClO₄

- a. ▲ Nitrazepam in Eisessig
- b. ■ Oxazepam in Eisessig
- c. ● 2-Amino-5-chlor-benzophenon in Eisessig

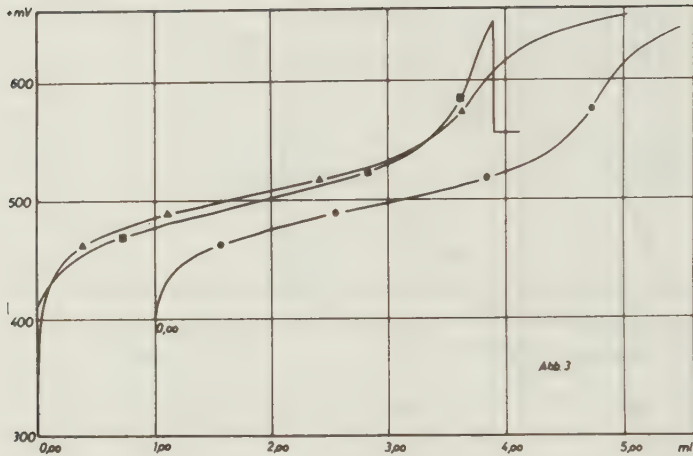


Abb. 3 : Titration mit 0,05n-HClO₄

- a. ▲ Oxazepam in Eisessig/Dioxan = 1/1
- b. ■ Oxazepam in Eisessig/Essigsäureanhydrid = 1/1
- c. ● Oxazepam in Eisessig/Essigsäureanhydrid = 1/0,04

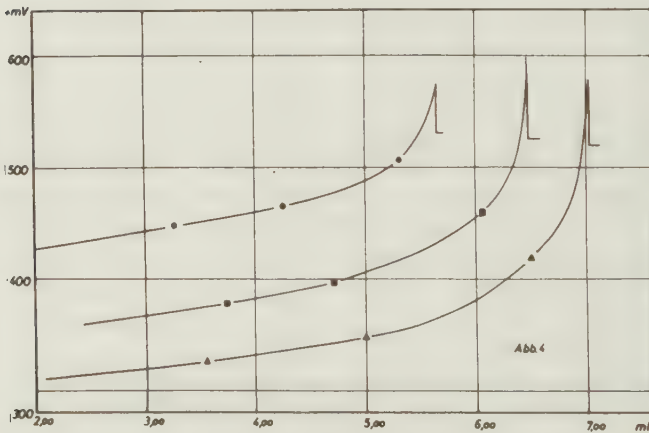


Abb. 4 : Titration mit 0,01n-HClO₄

- a. ▲ Diazepam in Essigsäureanhydrid
- b. ■ Nitrazepam in Essigsäureanhydrid
- c. ● Oxazepam in Essigsäureanhydrid

len eines Perchlorates (67) asymmetrische Kurven erhalten wurden.

c. Essigsäureanhydrid eignete sich nicht für Chlordiazepoxid-Hydrochlorid. Die Titrationskurven der anderen Benzodiazepine verliefen im Äquivalenzpunkt wesentlich steiler als in Eisessig, jedoch begann das Potential kurz danach stark abzusinken, so dass kein Wendepunkt ermittelt werden konnte (Abb.4). Dasselbe Verhalten zeigte sich mit einem Lösungsmittelgemisch Eisessig/Essigsäureanhydrid = 1/1, während ein 4%-iger Zusatz an Essigsäureanhydrid den Kurvenverlauf gegenüber reinem Eisessig nur unwesentlich veränderte (Abb.3). Als optimales Lösungsmittel für die potentiometrische Endpunktbestimmung kann daher Eisessig angesehen werden.

Tabelle 1 : Potentiometrische Endpunktbestimmung in Eisessig

Substanz	Formalität	x (%)	s (%)	$\frac{t \cdot s}{n}$	n
Chlordiazepoxid.HCl	0,05n-HClO ₄ 0,01n-"	99,6 100,4	0,20	0,35	10
Diazepam	0,05n-" 0,01n-"	99,6 100,3	0,23	0,19	9
Nitrazepam	0,05n-" 0,01n-"	99,9 99,9	0,70	0,56	8
Oxazepam	0,05n-"	99,2	0,47	0,39	8

Die gefundenen Fehler dürften vor allem auf Ablesefehler und kleinere Temperaturschwankungen zurückzuführen sein, zumal die Einwaagen bewusst niedrig gehalten wurden. Lediglich bei Oxazepam wurden von 100 etwas stärker abweichende Werte gefunden. Hier wurde auf eine Bestimmung mit 0,01n-HClO₄ verzichtet, da der Potentialsprung zu gering war.

3. Visuelle Endpunktbestimmung

Als günstiger Indikator erwies sich eine Lösung von Kristallviolett in Eisessig, den eine Reihe von Autoren benutzt haben (63,67,68). Er besitzt zwei Farbumschläge, von Violett nach Blau und weiter nach Gelb. Um zu prüfen, auf welchen Farbton im Äquivalenzpunkt in Eisessig titriert werden musste, wurden gleichzeitig die potentiometrischen Titrationskurven aufgenommen. Für Chlordiazepoxid wurde der Äquivalenzpunkt bei Blaugrün erreicht, während bei Diazepam bis Grünblau titriert wurde. Der Punkt der maximalen Farbänderung liess sich auch bei Nitrazepam recht gut erkennen. Oxazepam konnte auf Grund des schwachen Potentialsprungs in Eisessig nicht titriert werden. Nach den Titrationskurven (Abb.4) schien Essigsäureanhydrid für die visuelle Bestimmung gut geeignet zu sein. Auch hier wurde Kristallviolett als Indikator verwendet, titriert wurde bis Gelb. In diesem Lösungsmittel liess sich Oxazepam erfassen, während Diazepam und Nitrazepam sehr scharfe Umschlagspunkte ergaben. Nachteilig wirkte sich der relativ hohe Blindwert aus, der in Eisessig ausser acht gelassen werden konnte. Er war abhängig von dem Verhältnis Essigsäureanhydrid/Eisessig im Äquivalenzpunkt, so dass zu seiner Bestimmung etwa soviel Eisessig zugesetzt werden musste, wie Titrierflüssigkeit verbraucht wurde. Eine Zugabe von 5 ml Eisessig zu 30 ml Essigsäureanhydrid erhöhte den Blindwert von 0,08 auf 0,15 ml 0,05n-HClO₄. Man könnte den Blindwert also durch Verwendung von Perchlorsäure in Essigsäureanhydrid verkleinern, worauf hier der Einfachheit halber verzichtet wurde. Diazepam wird daher besser in Eisessig titriert, während beim Nitrazepam der schärfere Umschlagspunkt in Essigsäureanhydrid den Nachteil des hohen Blindwertes aufwiegt. Für Chlordiazepoxid scheidet Essigsäureanhydrid wegen der sekundären Methylamin-Gruppe aus.

Tabelle 2 : Visuelle Endpunktbestimmung

Substanz	Lsgsmttl.	x (%)	s (%)	$\frac{t}{\sqrt{n}} \cdot s$	n
Chlordiaz-epoxid.HCl	Eisessig	100,1	0,57	0,54	7
Diazepam	Eisessig Essigsäure- anhydrid	99,8	0,28	0,29	6
		99,8	0,43	0,45	6
Nitrazepam	Eisessig Essigsäure- anhydrid	99,9	0,21	0,26	5
		99,9	0,41	0,43	6
Oxazepam	Essigsäure- anhydrid	99,9	0,58	0,42	10

Bei den Titrationen in Essigsäureanhydrid war die relative Standardabweichung s deutlich grösser als in Eisessig.

4. Titrationen von Arzneimittelzubereitungen

Nach Feltkamp (69) stören Zucker, Stärke, Talcum, Stearinsäure, Methylzellulose u.a. die Titration mit Perchlorsäure in Eisessig nicht. Es wurde daher versucht, die Benzodiazepine direkt in verschiedenen Arzneiformen zu bestimmen, ohne die Begleitstoffe abzutrennen. Die Bestimmungen wurden in der trüben Suspension durchgeführt, da Filtration keine Veränderung der Ergebnisse brachte. Die verschiedenen Farbstoffe waren in Eisessig unlöslich und störten daher nicht. Nur unwesentlich oder garnicht durch Tablettenhilfstoffe veränderte Titrationskurven fanden sich bei Librium-Kaps. (10 mg Hydrochlorid), Librium-Drug. (25 mg Base) und Adumbran-Tbl. (10 mg) (Abb.5). Die Kapseln wurden ausgeklopft und abgetrennt, da sich sonst Überwerte ergaben (10-20%). Leal (54) fand für Librium-Kaps. (10 mg) mit UV-Spektrophotometrie 95-104% des Sollwertes. Beral (55) fand durch Titra-

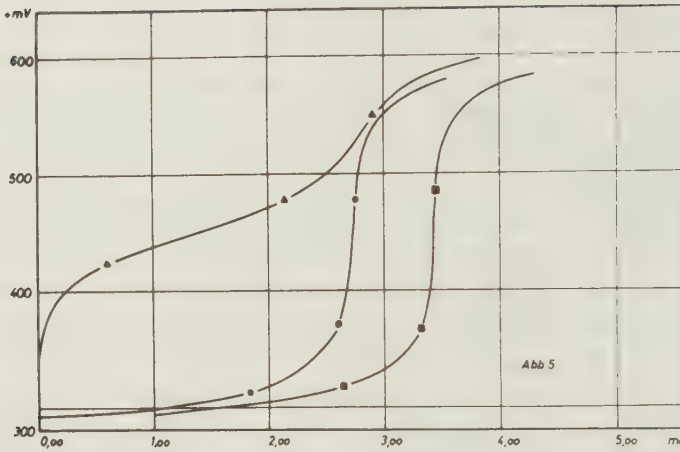


Abb. 5 : Titration mit 0,05n-HClO₄

- a. ▲ Adumbran-Tbl. (10mg) in Eisessig
- b. ■ Librium-Kaps. (10mg Hydrochlorid) in Eisessig mit Hg-II-acetat
- c. ● Librium-Drug. (25mg Base) in Eisessig

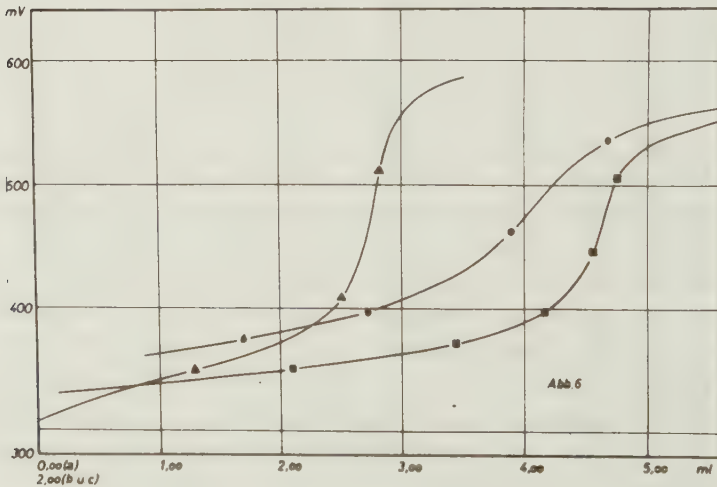


Abb. 6 : Titration mit HClO₄

- a. ▲ Valium-Tbl. (10mg) in Eisessig (0,05n-HClO₄)
- b. ■ Diazepam in Eisessig (0,01n-HClO₄)
- c. ● Valium-Tabl. (5mg) in Eisessig (0,01n-HClO₄)

tion mit Perchlorsäure in Dioxan für Librium-Drag. (10 mg Base) 104% des Sollwertes.

Die Ergebnisse für Valium-Tbl. (5 und 10 mg) liessen sich nur noch unsicher auswerten, da die Titrationskurven durch Pufferwirkung der Hilfsstoffe merklich abgeflacht waren. Alves (56) bestimmte Valium-Kaps. UV-spektrophotometrisch und titrimetrisch mit Perchlorsäure und erhielt übereinstimmend 104% des Sollwertes. (Abb.6).

Stark gestört waren die Titrationen bei dem Kombinationspräparat Pentrium (5 mg Librium-Base und 20 mg Pentaerythryltetranitrat) und Mogadan-Tbl. (5 mg). Diese bestimmte Oelschläger (44) UV-spektrophotometrisch und polarographisch.

Tabelle 3 : Titration von Arzneimittelzubereitungen

	n-HClO ₄	Methode	Lsgsmttl.	mg/Einheit	gef.
Librium-Kaps.	0,05	potentiom.	Eisessig	10	10,5
	0,01	potentiom.	Eisessig	10	10,3
	0,05	visuell	Eisessig	10	10,4
Librium-Drag.	0,05	potentiom.	Eisessig	25	24,3
	0,05	visuell	Eisessig	25	25,1
Valium-Tbl.	0,05	potentiom.	Eisessig	10	10,7
	0,05	visuell	Eisessig	10	10,4
Adumbran-Tbl.	0,05	potentiom.	Eisessig	10	10,3
	0,05	visuell	Essigsäureanhydrid	10	10,1

B III Farbreaktion nach Bratton-Marshall

1. Allgemeines

Da die Benzodiazepine im stark sauren Medium quantitativ zu 2-Amino-benzophenonen hydrolysieren (30),

lassen sie sich über ihre Hydrolyseprodukte durch Bildung eines Azofarbstoffes qualitativ und quantitativ bestimmen. Lediglich Diazepam ist auf Grund der N_1 -Methylierung nicht erfassbar. Die Autoren, die diese Methode bisher angewendet haben, geben z.T. recht unterschiedliche Versuchsbedingungen an, so dass hier ein einheitliches Verfahren für Chlordiazepoxid, Nitrazepam und Oxazepam ausgearbeitet werden sollte. Vor allem hinsichtlich der Extraktionsbedingungen sind noch keine systematischen Untersuchungen vorgenommen worden.

Pribilla (41) fand, dass N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin als Kupplungskomponente die Nachweisgrenze von Chlordiazepoxid auf der Dünnschichtplatte gegenüber β -Naphthol erheblich verbesserte. Dieses Reagenz haben Bratton u. Marshall (71) zur quantitativen spektrophotometrischen Bestimmung von Sulfanilamid eingeführt. Die besonderen Vorteile ihres Verfahrens sind die Beseitigung überschüssiger nitroser Gase durch Sulfaminsäure und die Verwendung einer basischen Kupplungskomponente, die im sauren Medium kuppelt, als Salz recht gut lösliche Azofarbstoffe liefert und auch bei niedrigen pH-Werten konstante Extinktionen ergibt. Die Reaktion verläuft rasch und ist sehr empfindlich. Um eine noch bessere Löslichkeit des Azofarbstoffes zu erreichen, führten Druey u. Osterheld (72) 1-Sulfo-methylamino-naphthalin-8-sulfonsäure als Kupplungskomponente ein, die ebenfalls alle angegebenen Vorteile aufweist.

(71) A.C.Bratton u.E.K.Marshall, J.Biol.Chem.
128,537(1939)

(72) J.Druey u.G.Osterheld, Helv.Chim.Acta
25,753(1942)

Diese Methode hat jedoch weniger Beachtung gefunden. Die Untersuchungen wurden hauptsächlich an Nitrazepam durchgeführt, für das eine optimale Methode ausgearbeitet wurde. Für Chlordiazepoxid und Oxazepam ergaben sich dabei aufschlußreiche Abweichungen (s.Tab.4, S.25), die im Interesse einer einheitlichen Bestimmungsmethode für alle drei Substanzen in Kauf genommen wurden. Als Arbeitsgrundlage diente folgende Methode: die Benzodiazepine wurden in Salzsäure zu den entsprechenden Benzophenonen hydrolysiert, diazotiert und mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin zu Azofarbstoffen gekuppelt. Die einzelnen Reaktionsparameter wurden systematisch untersucht.

2. Einfluss verschiedener Faktoren

a. Hydrolysedauer

Nitrazepam wurde in 5 ml 10%-HCl 1) 5 min., 2) 15 min. und 3) 30 min. am Rückflusskühler erhitzt und 30 min. nach der Kupplung ausgemessen : $E_1=1,585$, $E_2=1,60$, $E_3=1,625$ bei 10g/ml.

Es zeigte sich, dass die Hydrolyse bereits nach 5 min. fast beendet war und nach 30 min. nur geringfügig höhere Werte erhalten wurden. Die in der Literatur angegebenen Hydrolysezeiten (1/2-1 Stunde) können also erheblich gekürzt werden. Die weiteren Untersuchungen wurden mit 15 min. Hydrolysezeit in 10%-HCl durchgeführt.

b. Zeitpunkt der Messung nach der Kupplung

10g/ml Nitrazepam wurden nach verschiedenen Zeiten

ausgemessen :	nach 12 min.	$E=1,525$
"	20 min.	$E=1,495$
"	25 min.	$E=1,480$
"	30 min.	$E=1,465$
"	40 min.	$E=1,450$
"	49 min.	$E=1,450$
"	58 min.	$E=1,430$

Das Farbmaximum war bereits in sehr kurzer Zeit erreicht. Die Extinktion schien sich jedoch nach 30-50 min. am wenigsten zu verändern. Es wurde daher in der Folge nach 30-40 min. ausgemessen. Das Hydrolyseprodukt des Chlordiazepoxids ergab konstantere Werte: zwischen 20-70 min. wurde kein Extinktionsverlust gefunden.

c. Einfluss der Säurekonzentration auf die Farbintensität

Nitrazepam wurde in 5 ml 10%-HCl hydrolysiert und danach die HCl-Konzentration in der Messlösung auf folgende Werte eingestellt:

1. 7½%-HCl (E=1,46 bei 10_g/ml)
2. 4%-HCl (E=1,47 " ")
3. 2%-HCl (E=1,445 " ")
4. 1%-HCl (E=1,36 " ")
5. 0,4%-HCl (E=0,915 " ")

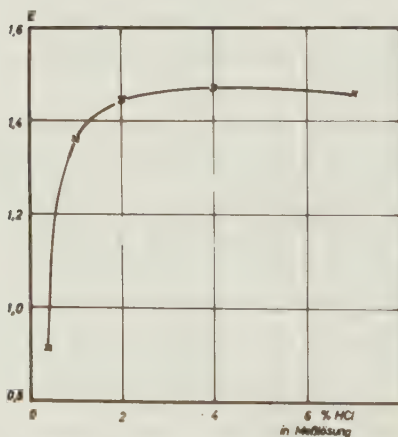


Abb. 7 Abhängigkeit der Farbintensität von der HCl-Konzentration

Die Werte schwankten nur wenig zwischen 2-7 %-HCl, das Optimum lag bei 4 %-HCl. Die HCl-Konzentration in der Messlösung sollte daher möglichst auf diesen Bereich eingestellt werden.

3. Extraktionsbedingungen

a. Hydrolyse vor Extraktion

Nitrazepam wurde in HCl hydrolysiert und das entstandene Benzophenon bei pH 8-10 mit Äthylacetat extrahiert. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde die Äthylacetatphase abgedampft

und der Rückstand mit

- 1) 5 ml 10 %-HCl ($E=0,91$), (ohne Extraktion theoretisch)
- 2) 5 ml 0,2n-HCl ($E=0,72$) tisch $E \approx 1,5$ für 10 μ /ml) unter Erwärmen aufgenommen.

Die Werte waren bei einem grossen Extinktionsverlust schlecht reproduzierbar.

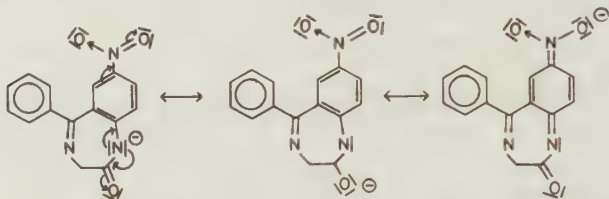
Wurde die Äthylacetatphase nicht eingedampft, sondern mit 5 ml 10 %-HCl ausgeschüttelt, betrug die Extinktion nur noch 0,045, d.h. das entsprechende Benzophenonderivat liess sich mit 10 %-HCl nicht aus organischen Lösungsmitteln extrahieren. Das galt auch für das Hydrolyseprodukt des Chlordiazepoxids bzw. Oxazepam, das sich bereits bei der Titration im nichtwässrigen Medium als extrem schwache Base erwiesen hatte.

Die Hydrolyse wurde daher erst nach erfolgter Extraktion vorgenommen, wodurch bei Extraktion aus Harn zusätzlich kleinere Blindwerte erhalten wurden. Walkenstein und Mitarb. (38) umgingen die Schwierigkeit der Reextraktion des Hydrolyseproduktes von Oxazepam durch Verwendung eines Diazotierungsgemisches (NaNO_2/HCl) als Extraktionsmittel.

b. Hydrolyse nach Extraktion

Es ergab sich kein Unterschied, ob Nitrazepam aus Wasser bei pH 8 oder pH 10 mit Äthylacetat extrahiert wurde.

Dagegen ließ sich Nitrazepam nach einer Zugabe von 1n-NaOH zu einer wässrigen Lösung nicht mehr quantitativ extrahieren, da es schwach N_1 -H-acid ist und sich mit intensiv gelber Farbe in wässrigem Alkali löst.



Wurden 250 γ Nitrazepam aus 10 ml Wasser anstatt mit 1 mal 10 ml mit 2 ml 5 ml Äthylacetat ausgeschüttelt, stieg die Ausbeute um ca. 5%.

Um den Einfluß der Säurekonzentration auf die Reextraktion aus Äthylacetat zu prüfen, wurde Nitrazepam aus 10 ml Äthylacetat mit

- 1) 5 ml 0,2n-HCl ($E=0,28$ bei 10 γ /ml)
- 2) 5 ml 1,0n-HCl ($E=0,93$ " ")
- 3) 5 ml 10%-HCl ($E=1,41$ " ")
- 4) 5 ml 25%-HCl ($E= 1,11$ " ")

extrahiert, die HCl-Phasen auf 5%-HCl verdünnt bzw. konzentriert und die Farbreaktion vorgenommen.

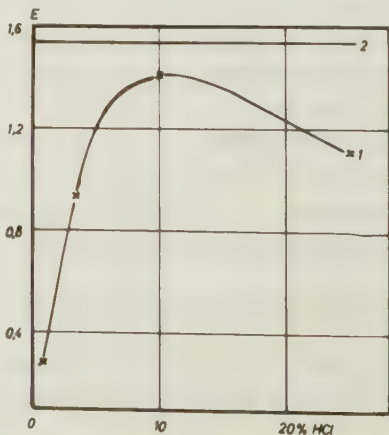


Abb. 8 : Abhängigkeit der Reextraktion von der HCl-Konzentration
1. Extinktion mit Extraktion
2. Extinktion ohne Extraktion

Mit 25%-HCl trat teilweise Zersetzung des Äthylacetats ein. Die Reextraktion erfolgte also optimal mit 10%-HCl.

Kein Unterschied ergab sich, wenn Nitrazepam aus 5 oder aus 10 ml Äthylacetat mit 5 ml 10%-HCl ausgeschüttelt wurde.

4. Eichkurven und Diskussionen

Nach der im experimentellen Teil angeführten Vorschrift wurden Eichkurven für Nitrazepam, Chlordiazepoxid-Hydrochlorid und Oxazepam aufgestellt. Die Extinktionen bei 3g/ml Messlösung wurden aus den Kurven graphisch ermittelt und in Tabelle 4 ausgewertet.

Tabelle 4 : Extinktionen E bei 3g/ml Lösung

Substanz	E	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	theoret. E bei quant Hydrolyse	% d. Ther.	E-Abfall
2-Amino-5-nitro-benzophenon	0,545	1817 (533-35nm)			
Nitrazepam	0,46		0,469	98,1	
" (Extr. aus Wasser)	0,435				5,4 %
" (Extr. aus Harn)	0,39				15,2 %
2-Amino-5-chlor-benzophenon	0,510	1700 (543-45nm)			
Chlordiazepoxid.HCl	0,340		0,351	96,9	
" (Extr. aus Wasser)	0,305				10,3 %
" (Extr. aus Harn)	0,240				28,4 %
Oxazepam	0,350		0,412	85,0	
" (Extr. aus Wasser)	0,265				15,6 %
" (Extr. aus Harn)	0,250				28,6 %

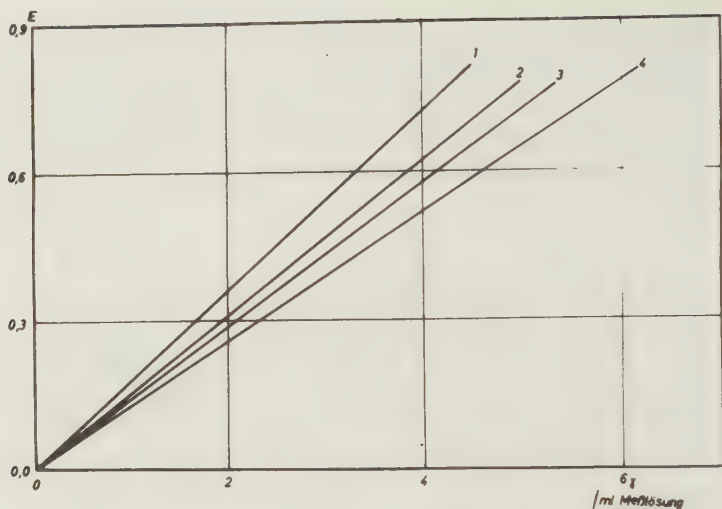


Abb. 9 : Eichkurven für die Bratton-Marshall-Reaktion
 1) 2-Amino-5-nitro-benzophenon 2) Nitrazepam
 3) Nitrazepam mit Extraktion aus Wasser
 4) Nitrazepam mit Extraktion aus Harn

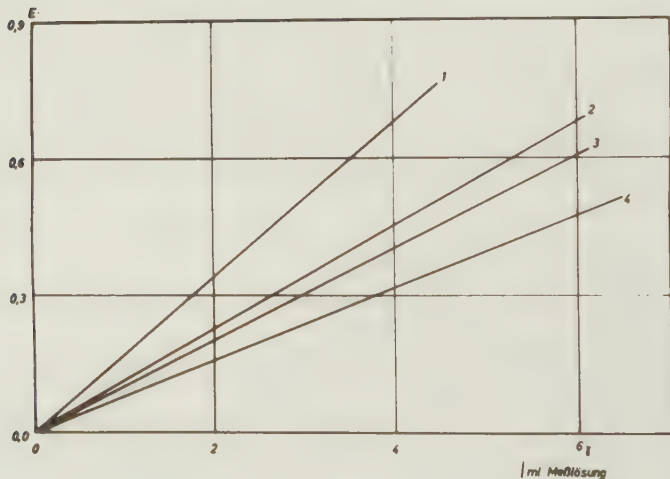


Abb.10 : Eichkurven für die Bratton-Marshall-Reaktion
 1) 2-Amino-5-chlor-benzophenon 2) Chlordiazepoxid·HCl
 3) Chlordiazepoxid·HCl mit Extraktion aus Wasser
 4) Chlordiazepoxid·HCl mit Extraktion aus Harn

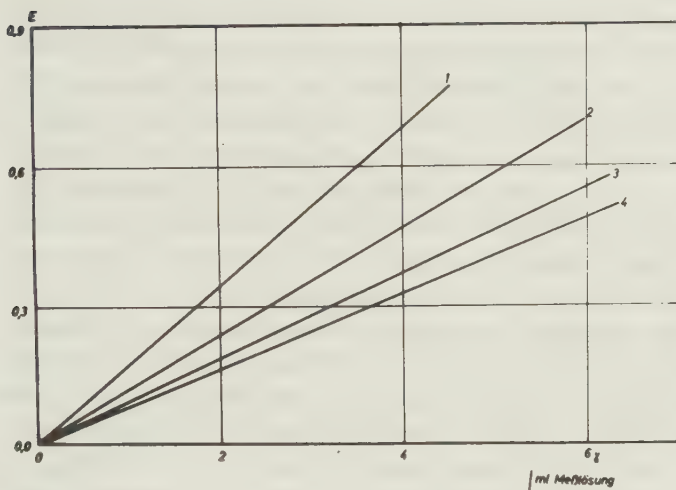


Abb.11 : Eichkurven für die Bratton-Marshall-Reaktion

- 1) 2-Amino-5-chlor-benzophenon, 2) Oxazepam
- 3) Oxazepam mit Extraktion aus Wasser
- 4) Oxazepam mit Extraktion aus Harn

Für die 2-Amino-benzophenone wurden die spezifischen Extinktionen ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) errechnet, für die Benzodiazepine die prozentuale Abweichung von den Extinktionen, die bei 100%-iger Hydrolyse zu den entsprechenden 2-Amino-benzophenonen theoretisch zu erhalten sind (%d.Theor.). Ausserdem wurden die Extinktionsverluste angegeben, die durch das erarbeitete Extraktionsverfahren entstanden (E-Abfall durch Extraktion).

Die spezifische Extinktion (1 cm, 1 %) war bei 2-Amino-5-nitro-benzophenon etwas höher als bei 2-Amino-5-chlor-benzophenon. Aus den Extinktionen ergab sich, dass Nitrazepam und Chlordiazepoxid fast quantitativ hydrolysierten, während Oxazepam eine deutlich geringere Extinktion aufwies, als bei 100%-iger Hydrolyse zu erwarten wäre (nur etwa 85%). Auf Grund der Iminocarbinol-Struktur, die eine potentielle Aldehydfunktion darstellt, schienen hier bei den gewählten

Hydrolysebedingungen noch Nebenreaktionen stattzufinden. Der Extinktionsabfall nach Extraktion betrug bei Nitrazepam 5,4 %, bei Chlordiazepoxid-Hydrochlorid 10,3% und bei Oxazepam als bei weitem schwächster Base 18,6%. Der relativ höhere Extinktionsabfall des Chlordiazepoxids als stärkster Base kann auf einer teilweisen Hydrolyse in 10%-HCl zu dem sogenannten "Laktam" (vergl S.2) beruhen, das keine basischen Eigenschaften mehr aufweist. Extraktionen aus Harn zum toxikologischen Nachweis ergaben je nach Harnbeschaffenheit einen weiteren Extinktionsverlust von etwa 10%. Die hier erhaltenen Werte müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da derartige Zumischungsversuche von Reinsubstanz zu biologischem Material auf Grund nicht genau bekannter Bindungen immer problematisch sind. Die Grenze für quantitative Bestimmungen lag zwischen 0,25 μ /ml 2-Amino-5-nitro-benzophenon und 0,5 μ /ml Oxazepam (E=0,05).

B IV Kernmagnetische Protonenresonanz (N.M.R.)

=====

(Wir danken Herrn Dr.Rehse für die Hilfe bei der Deutung der Spektren.)

Zur weiteren Charakterisierung wurden die N.M.R.-Spektren der Benzodiazepine und ihrer Hydrolyseprodukte aufgenommen. (Abb.12-19)

Als Lösungsmittel diente Dimethylsulfoxid-d₆, (DMSO-d₆), das zwar als sehr polare Flüssigkeit gewisse Wechselwirkungen mit den zu untersuchenden Substanzen erwarten liess, aber günstige Lösungseigenschaften zeigte (s.73). Das Lösungsmittelsignal des nicht deuterierten DMSO lag bei δ =2,5 ppm mit der Wasserverunreinigung bei δ =3,3 ppm.

(73) H.Suhr, Anwendungen der Kernmagnetischen Resonanz in der organischen Chemie, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965

1. N-H-Protonen

Die Säureamidprotonen von Nitrazepam und Oxazepam ergaben überraschend scharfe Signale und tauschten offensichtlich nicht mit den Wasserprotonen aus (vergl.74). Die N-H-Protonen der restlichen Substanzen lieferten wesentlich breitere Signale. Dieser Effekt liess sich auf das die Relaxationszeit verkürzende Quadrupolmoment des ^{14}N zurückführen. Bei 2-Amino-5-chlor-benzophenon und 2,5-Diamino-benzophenon, dem reduzierten Hydrolyseprodukt des Nitrazepams, kam als weiterer verbreiternder Effekt der Protonenaustausch mit der Wasserverunreinigung des DMSO-d6 dazu. Das Wassersignal wurde dadurch ebenfalls abgeflacht. Die NH-CH_3 -Gruppierung des Chlordiazepoxids und des 5-Chlor-2-methylamino-benzophenons ergab in DMSO-d6 ein Dublett für die Methylgruppe und, durch starke Abflachung nur undeutlich erkennbar, ein Quadruplett für das N-H-Proton. Diese Aufspaltung war ein Beweis dafür., dass die Verbreiterung des N-H-Signals nicht durch Austausch mit den Wasserprotonen zustande kam. In CDCl_3 fiel das Dublett der Methylgruppe des 5-Chlor-2-methylamino-benzophenons zu einem Singulett zusammen.

(74) J.D.Roberts, J.Am.Chem.Soc.78,4495(1956)

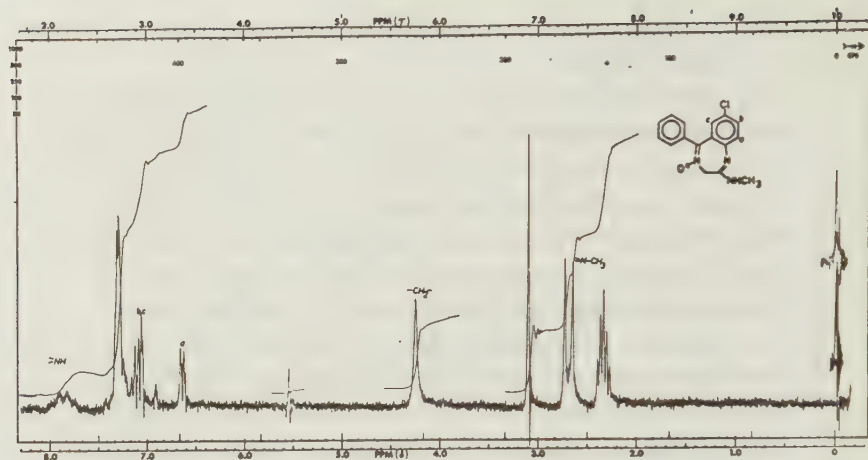


Abb.12: Chlordiazepoxid-Base (sweep width 500 cps)

N-H: q (angedeutet), 7,85 , $J=4,5$ Hz (1 H) $\approx$
 CH₂: s , 4,25 , (2 H)
 N-CH₃: d , 2,70 , $J=4,5$ Hz , (3 H)
 H_a : dd , 6,63 , $J=2,5$ und 1 Hz , (1 H)
 arom.H: m , 6,85-7,45 , (7 H)

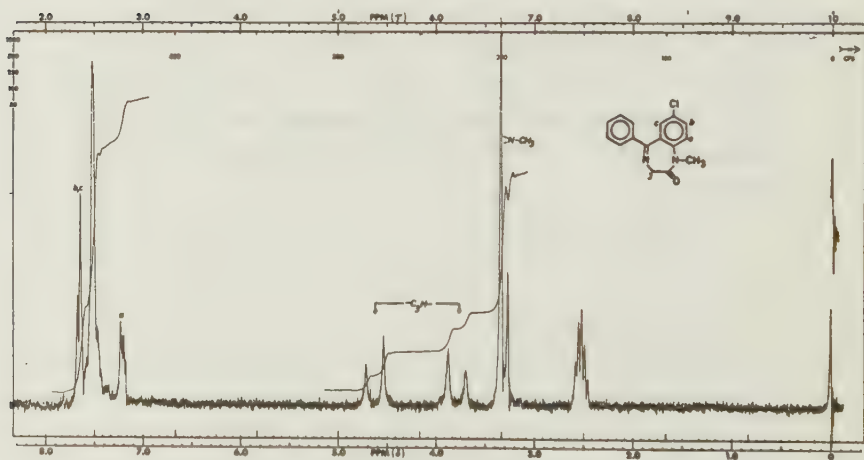


Abb.13: Diazepam N-CH₃: s, 3,35 (3 H) (sweep width 500 cps)
 CH₂: d, 4,63 , $J=11$ Hz
 und d, 3,80 , $J=11$ Hz, (je 1 H)

$\approx$) δ in ppm, s=Singulett, d=Doublett, t=Triplet, q=Quadruplett und m=Multipllett , Reihenfolge der Zahlenangaben: Multiplizität, chem.Verschiebung δ , Kopplungs-konstante J , Zahl der Protonen

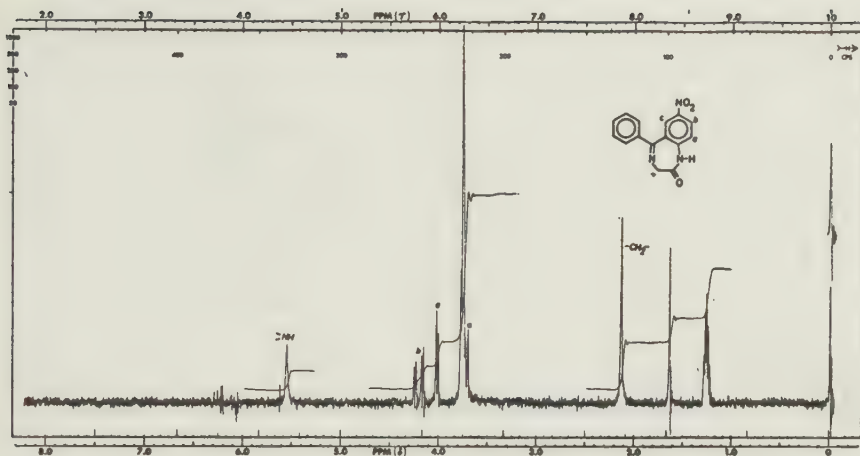


Abb.14 : Nitrazepam (sweep width 1000 cps)

N-H: s 11,1 , (1 H)
 CH₂: s 4,26 , (2 H)
 H_b: dd 8,40 , J=9 und 3 Hz, (1 H)
 H_c: d 8,05 , J=3 Hz, (1 H)
 arom.H: m 7,30-7,60 , (6 H)

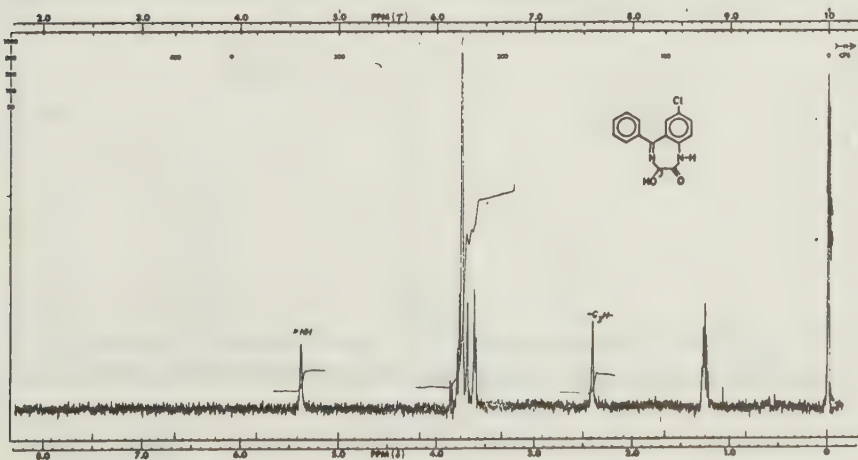


Abb.15 : Oxazepam (sweep width 1000 cps)

N-H: s 10,76 , (1 H)
 C₂-H: s 4,80 , (1 H)
 arom.H: m 7,10-7,74 , (6 H)

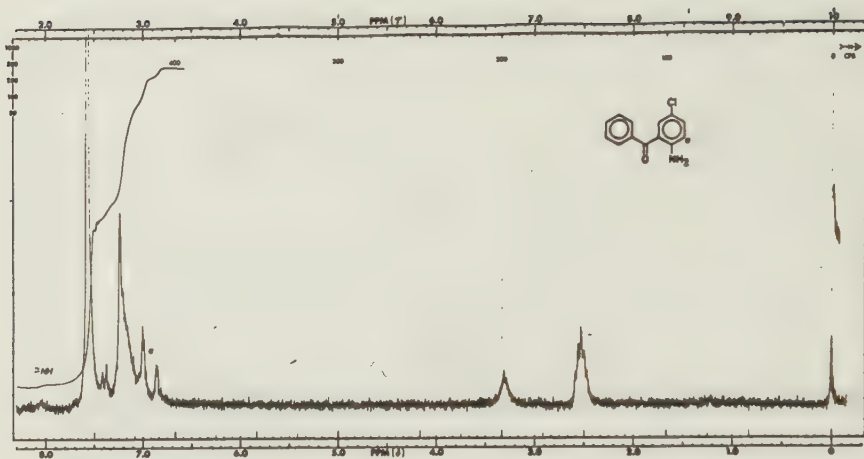


Abb.16 : 2-Amino-5-chlor-benzophenon (sweep width 500 cps)

NH₂: s 8,05 , (<2H), sehr flach, Austausch mit
arom.H: m 6,80-7,70 , (8 H) Wasser)

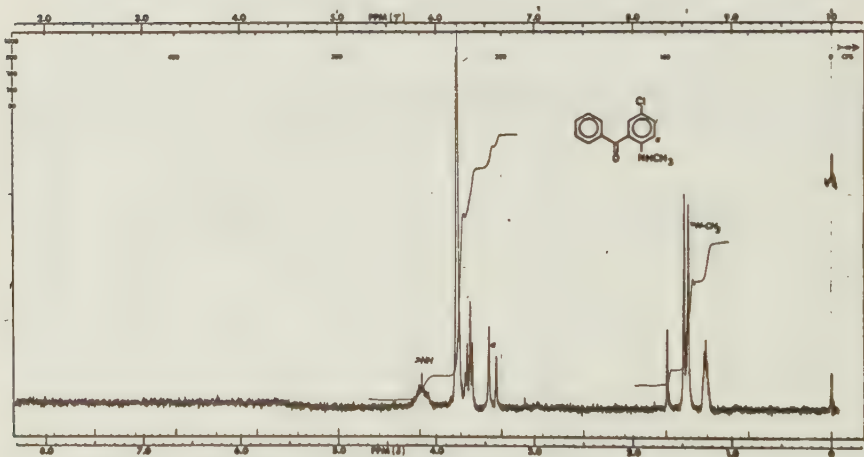


Abb.17 : 5-Chlor-2-methylaminobenzophenon (sweep width 1000 cps)

N-H: 8,30, flach , (1 H)
N-CH₃: d 2,90 , J=5, (3 H)
H : ³d 6,85 , J=9 Hz, (1 H)
arom.H: m 7,20-7,70 , (7 H)

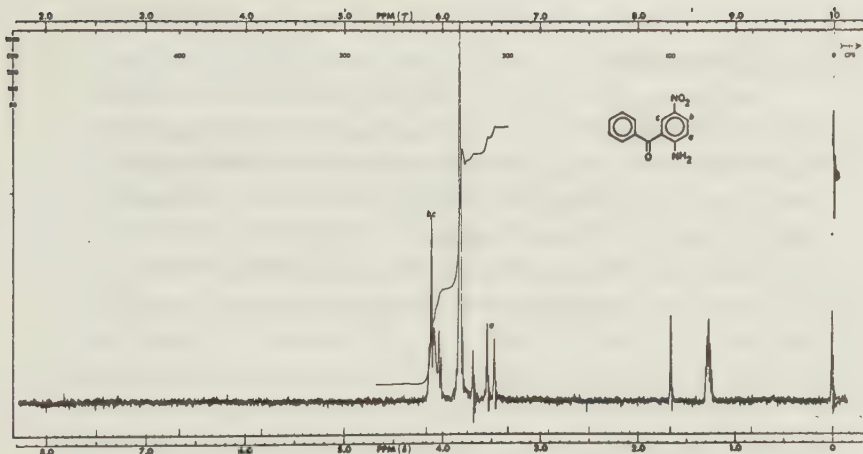


Abb. 18 : 2-Amino-5-nitro-benzophenon (sweep width 1000 cps)

H^a : d 7.02 , J=9 Hz (1 H)
H^{a,b,c} : m 8.0-8.34, (>2H, da mit dem NH₂-Signal überlagert)
arom.H. : m 7.66 , (5 H)
Benzolsignal bei 7.35

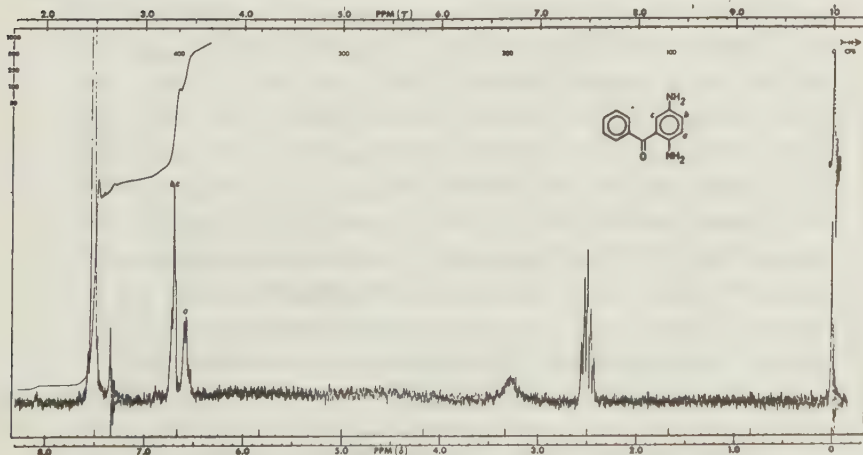


Abb. 19 : 2,5-Diamino-benzophenon (sweep width 500 cps)

H^{a,b,c} : m 6.50-6.77, (3 H)
arom.H. : m 7.40-7.60, (5 H)
NH : 4-5 und 5,3-6,3, sehr flach, Austausch mit Wasser

2. O-H-Protonen

Im Spektrum des Oxazepam (Abb.15) waren die Signale des Wassers und der O-H-Protonen durch raschen Austausch ganz verschwunden, obwohl DMSO-d₆ stabilisierend auf die O-H-Gruppen wirken sollte (75). Offensichtlich war das O-H-Proton relativ locker gebunden. Das C₃-H-Proton ergab ein Singulett bei $\delta=4,80$ ppm (76).

3. Aromatische Protonen

Aus der Signalgruppe für die aromatischen Protonen war bei den chlorierten Derivaten das Proton in 9-Stellung der Benzodiazepine (H_a) bzw. in 3-Stellung der Benzophenone (H_a) meist als unregelmässiges Multiplett nach höherem Feld abgesetzt (Abb. 12,13,15-17). Bei den Derivaten mit Nitro-Gruppe fielen die ortho-Protonen als Dublett (H_c, meta-Kopplung: J=3 Hz) bzw. als Quadruplett (H_b, ortho-meta-Kopplung: J=9 und 3 Hz) nach tieferem Feld (Abb.14 und 18). Das Integral für die ortho-Protonen des 2-Amino-5-nitro-benzophenons (H_a und H_b) stimmte nicht mit dem berechneten Wert für zwei Protonen überein, da das flache Resonanzsignal für die NH₂-Protonen darunter lag. Im Spektrum des 2,5-Diamino-benzophenons (Abb.19) waren alle Protonen des substituierten Ringes durch den Einfluss der Amino-Gruppen nach höherem Feld abgesetzt. Die Amino-Gruppen selbst ergaben ein extrem flaches Signal.

4. Konformationen der 1,4-Benzodiazepin-2-one

a. AB-Spektrum der C₃-Methylen-Protonen

Wie kürzlich berichtet, ergab die Methylen-Gruppe in 3-Stellung einiger Benzodiazepine ein Singulett (76). Beim Diazepam fanden wir jedoch eine Aufspaltung in zwei Dubletts bei $\delta=4,63$ und $3,80$ ppm. (Abb.13)

Diese Aufspaltung war nach unserem damaligen Wissen erst bei einem dem "Laktam" des Chlordiazepoxids isomeren Benzoxadiazocin, nicht jedoch z.B. bei dem "Laktam" selbst beobachtet worden (76). Die Methylenprotonen des Diazepam erschienen als AB-System ($J/\delta=0,22$) mit einer Kopplungskonstanten von $J=11$ Hz in DMSO- d_6 (Abb.13) und $CDCl_3$ (geminale J vergl.77-79). Danach musste Diazepam in zwei äquivalenten Konformationen vorliegen. Karle und Karle (80) stellten in ihrer Arbeit über die Molekülstruktur eines 4,5-Dihydro-1,4-dimethyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-ons fest, dass die Gruppierung $-(N-CH_3)-(C=O)-CH_2-$ mit dem planaren N_1 -Atom fast in einer Ebene lag. Der ankondensierte Benzolring war zu etwa 50° zu dieser Ebene gedreht, bedingt durch den Ringschluss zum 7-Ring. In Analogie liessen sich bei Diazepam zwei äquivalente Konformationen mit einem jeweils nach einer Seite verdrehtem Benzolring (Ring A) am Molekülmodell konstruieren. Die Methylgruppe kam dadurch einmal oberhalb und einmal unterhalb der Ebene des Benzolringes zu liegen (Abb.20). Der Übergangszustand zwischen den beiden wannenartigen Formen war offensichtlich sterisch gehindert. Fehlte die N_1 -Methylgruppe, vollzog sich die Umwandlung der beiden Konformeren so schnell, dass im N.M.R.-Spektrum nur noch eine mittlere Abschirmung der C_3 -Protonen gemessen wurde, die im Äquatorial-Axial-System ihre Lage wechselten.

Um die Bedeutung der sterischen Hinderung durch N_1 -Methylierung zu beweisen, wurde Nitrazepam ebenfalls zum N_1 -Methyl-nitrazepam methyliert (81) und das N.M.R.-Spektrum in DMSO- d_6 aufgenommen. Jetzt erschien auch hier das AB-Spektrum der C_3 -Methylen-Protonen ($\delta=4,05$ und $3,22$ ppm, $J=11$ Hz), da die Umwandlung der Konformationen langsam genug erfolgte.

(75) O.L.Chapman u.R.W.King, J.Am.Chem.Soc. 86,1256(1964)

b. Wannenform-Sesselform

Im Verlauf dieser Untersuchungen erhielten wir Kenntnis von weiteren N.M.R.-Untersuchungen über Benzodiazepine (82-84)

Mannschreck und Mitarb. (82) schlugen auf Grund von N.M.R.-Analysen der Konformationen von Azepinen und Liazepinen für diese Stoffgruppen eine Wannenform vor, die in zwei Konformationen existierte. Sie beschrieben auch das AB-Spektrum der Methylen-Gruppe des Diazepam und führten die relativ hohe freie Aktivierungsenthalpie der Umwandlung ($\Delta G_C^\ddagger = 17,5$ kcal/Mol) ebenfalls auf sterische Hinderung zurück.

Linscheid u. Lehn (83) ersetzten die N_1 -Methyl-Gruppe des Diazepam durch sperrige Gruppen wie Äthyl-, Isopropyl- und Benzyl-Reste und wiesen nach, dass die Aktivierungsenergie der Umwandlung durch sterische Hinderung in steigendem Maß vergrößert wurde. Sie fassten den 1,4-Benzodiazepin-2-on-Ring wegen des partiellen Doppelbindungscharakters der Säureamid-C-N-Bindung als einen Mittelzustand zwischen der Pseudo-Wannenform des Cycloheptadiens und der Wannenform des Cycloheptatriens auf. Das AB-Spektrum des Diazepam bei 30°C verschmolz bei 96°C durch raschere Umwandlung zu einem Singulett.

Muhn und Bley (84) dagegen vermuteten, dass die N_1 -Methyl-Gruppe des Diazepam sich in trans-Stellung

-
- (76) A. Stempel, J. Douvan, E. Reeder u. L. H. Sternbach
J. Organ. Chem. 32, 2117 (1967)
 - (77) H. S. Gutowsky, M. Karplus u. L. B. Grant, J. Chem. Phys.
31, 1278 (1959)
 - (78) H. Fritz u. W. Löwe, Angew. Chem. 74, 751 (1962)
 - (79) J. A. Poole u. A. A. Bothner-By, J. Chem. Phys. 42, 1339 (1965)
 - (80) J. Karle u. I. L. Karle, J. Am. Chem. Soc. 89, 804 (1967)
 - (81) L. H. Sternbach, R. J. Fryer, O. Keller, W. Metlesics,
G. Sach u. R. Steiger, J. Med. Chem. 6, 261 (1963)

zum C=O befand und dass infolgedessen der 7-Ring des Diazepam in einer Sesselform vorlag. Die trans-Stellung der N₁-Methyl-Gruppe versuchten sie durch die grosse Verschiebung des Methyl-Signals im N.M.R.-Spektrum mit Benzol gegenüber Methylenchlorid als Lösungsmittel nach höherem Feld zu beweisen. Der entstehende Benzolkomplex ist bei trans-Stellung stabiler als bei cis-Stellung und führt durch bessere Abschirmung der trans-Methyl-Gruppe zu einer grossen Verschiebung nach höherem Feld. Diese Untersuchungen wurden jedoch an relativ einfachen Molekülen vorgenommen (85) und können nicht ohne weiteres auf komplizierte Strukturen wie die des Diazepam übertragen werden.

Gegen die trans-Stellung der Methyl-Gruppe sprechen folgende Punkte :

- a. Durch Messung von Dipolmomenten wiesen Huisgen u. Walz (86) nach, dass in aliphatischen Laktamen eine trans-Konfiguration erst ab 10-gliedrigen Ringen spannungsfrei auftrat.
- b. Charakteristisch für IR-Spektren der 1,4-Benzodiazepin-2-one mit der Struktur -NH-(C=O)- war das Fehlen der Amid-II-Bande, die bei trans-Stellung auftreten müsste. Das Laktam lag also cis-konfiguriert vor.

(82) A. Mannschreck, G. Rissmann, F. Vögtle u. D. Wild, Chem. Ber. 100, 335 (1967)

(83) P. Linscheid u. J.-M. Lehn, Bull. Soc. Chim. Fr. 1967(3), 992

(84) P. Nuhn u. W. Bley, Pharmazie 22, 532 (1967)

(85) L. A. La Planche u. M. T. Rogers, J. Am. Chem. Soc. 86, 337 (1964)

(86) R. Huisgen u. H. Walz, Chem. Ber. 89, 2616 (1959)

N_1 -Methylierung im Diazepam dürfte kaum einen Wechsel zur trans-Stellung herbeiführen.

c. Die Untersuchungen von Karle u. Karle (80) sprechen ebenfalls für die cis-Konfiguration.

Damit war die trans-Stellung der Methyl-Gruppe des Diazepams unwahrscheinlich geworden, von der die

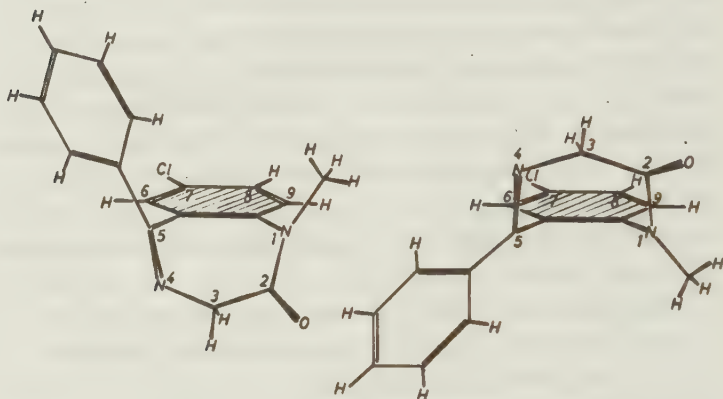


Abb.20: Konformationen des Diazepams

Sesselform des 7-Ringes abgeleitet wurde. Die richtige Struktur stellte eine Art Wannenform dar, wie sie in der Abb.20 dargestellt ist.

5. Acidität des "Laktams" (7-Chlor-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on-4-oxid)

Das bei kontrollierter Hydrolyse des Chlordiazepoxids bei pH 4,6 entstehende "Laktam" (vergl. 5,87) wies, wie bereits mehrfach beschrieben, saure Eigenschaften durch den zusätzlichen Elektronenzug der $N \rightarrow O$ -Bindung auf. Das UV-Spektrum in Methanol (Max. bei 310 und 238 nm, Min. bei 283 nm) ergab, dass bei der Umsetzung die Nitronform und nicht das Oxaziridin-

Isomere erhalten wurde (vergl. DI,1 und CII, .47).

Hier galt es zu klären, ob die Verbindung N_1 -H- oder C_3 -H-acid war.

Das N.M.R.-Spektrum in DMSO (N_1 -H : s 10,50 (1H); C_3 -H : s 4,35 (2H)) zeigte im Gegensatz zum Spektrum des Nitrazepams (Abb.14) und Oxazepams (Abb.15) eine Abflachung des N_1 -H-Signals und der Wasserverunreinigung. Wegen der günstigen Lage der Signale konnte nicht-deuteriertes DMSO verwendet werden. Beim Schütteln der Probelösung mit etwas deuteriertem Wasser verschwand der N_1 -H-Peak durch raschen Austausch, während das Signal für die Methylenprotonen nicht verändert wurde.

Zum endgültigen Beweis der N_1 -H-Acidität wurde das in N_1 -Stellung methylierte Laktam durch Oxydation des Diazepam mit H_2O_2 hergestellt. Auch hier wurde direkt das Nitron-Derivat erhalten, obwohl die Oxydation von Schiff'schen Basen mit H_2O_2 als Sytheseweg für Oxaziridine beschrieben worden war (88).

Das methylierte Produkt löste sich im Gegensatz zum "Laktam" nicht in ln-NaOH. Der Einfluß des Nitrons erstreckte sich hier also über 4 Bindungen bis zum N_1 -Atom.

(87) L.H.Sternbach u.E.Reeder, J.Organ.Chem.

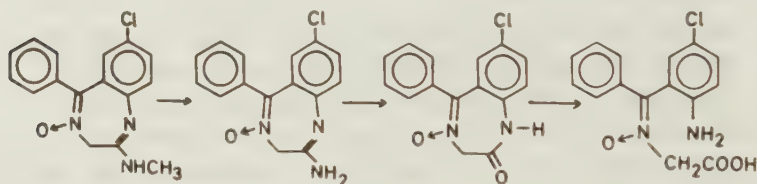
26,4936(1961)

(88) E.Schmitz, Dreiringe mit zwei Heteroatomen
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,
1967

C METABOLISMUS DER BENZODIAZEPINE

C I Literaturübersicht

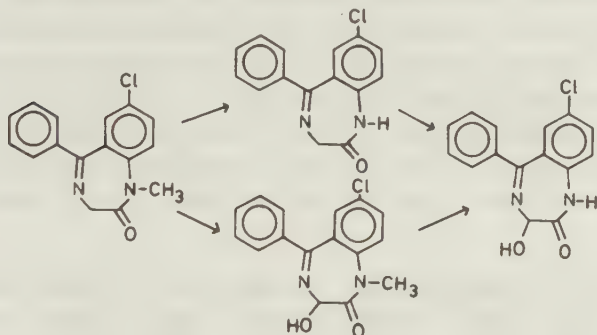
Die Benzodiazepine werden im Menschen zum grössten Teil metabolisiert, so dass im Harn nur noch geringe Mengen des unveränderten Produktes ausgeschieden werden, von Chlordiazepoxid etwa 1-2% (5,41). Bei Untersuchungen mit ^{14}C -markiertem Chlordiazepoxid konnte kein über die Lungen abgeatmetes $^{14}\text{CO}_2$ festgestellt werden, das bei einem oxydativen Abbau des 7-Ringes auftreten müsste (89,90). Der wichtigste Metabolisierungsschritt stellt die Spaltung zum "Laktam" dar (5), der eine Entmethylierung vorausgeht (91). Weiterhin bildet sich unter Ringöffnung das "offene Laktam" (90).



Ein Teil der Metaboliten liegt als Glucuronid vor (39,41). Oxazepam wird im Harn fast nur gebunden als β -Glucuronid vom Äthertyp ausgeschieden (38). Beim Diazepam findet als schnellster Metabolisierungsschritt eine Demethylierung statt (35,92,93), den eine langsamere Hydroxylierung am C_3 begleitet (92,93), so dass schliesslich Oxazepam entsteht. Diese Hydroxylierung ist zuerst an Microorganismen und kürzlich

- (39) B. A. Koechlin u. L. A. Schwartz, Fed. Proc. 20, 171 (1961)
- (40) B. A. Koechlin, L. A. Schwartz, G. Frol u. M. Oberhansli, J. Pharmacol. Expt. Ther. 146, 399 (1965)
- (41) L. A. Schwartz u. E. Postma, J. Pharm. Sci. 55, 1358 (1966)
- (42) J. Jomai, P. Linnite u. L. A. Silanos, Arch. Biochem. Biophys. 108, 344 (1964)
- (43) L. A. Schwartz, B. A. Koechlin, E. Postma, S. Palmer u. G. Frol, J. Pharmacol. Expt. Ther. 149, 423 (1965)

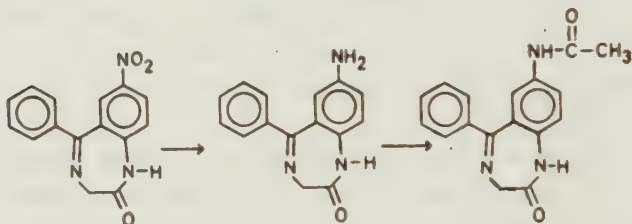
bei Tierversuchen mit Hunden (95) auch am Beispiel des Chlordiazepoxids in kleinerem Umfang beobachtet worden (94).



Nach Gabe von Tritium-markiertem Diazepam wurden 70% im Harn wiedergefunden (96), und zwar Oxazepam als Hauptmetabolit, von dem im Blut nur geringe Mengen nachweisbar waren (97). Ein grosser Teil lag gebunden als Glucuronid vor (93). Untersuchungen mit Hilfe der Gas-Liquid-Chromatographie ergaben, dass Diazepam rasch vom Mutterkreislauf auf den Fetus diaplacentar übertragen wird und die Plasmaspiegel etwa gleich hoch liegen (37,98,99), nach einer oralen Gabe von 20 mg ca 0,2 μ /ml Plasma (100). Hydroxylierung am 5-Phenyl-Ring ist bisher erst in Kaninchen (92) und Ratten (101,102), nicht jedoch im Menschen festgestellt worden. Das stimmt mit der Beobachtung von Robinson (103) überein, dass Benzophenon selbst als Gerüst der Benzodiazepine nicht aromatisch hydroxyliert wurde.

-
- (94) H.W.Ruelius, J.M.Lee u.H.E.Alburn, Arch.Biochem. Biophys. 111, 376(1965)
 (95) H.B.Kimmel u.S.S.Walkenstein, J.Pharm.Sci. 56, 538(1967)
 (96) M.A.Schwartz, B.A.Koechlin u.G.Krol, Fed.Proc. 22, 367(1963)
 (97) J.A.F.de Silva, B.A.Koechlin u.G.Bader, J.Pharm.Sci. 55, 692(1966)

Der Metabolismus von Nitrazepam scheint noch komplexer zu sein. Pribilla (43) vermutete fünf Ausscheidungsprodukte im Harn, Rieder (42) neben dem 7-Amino- und 7-Acetamido-Metaboliten noch eine unbestimmte Zahl weiterer Abbauprodukte in kleineren Mengen. Offensichtlich stellt die Nitrogruppe eine schwache Stelle des Moleküls dar, an der für Metabolisierungsprozesse seltenere Reduktionen stattfinden. Reduktion von NO_2 - und NO -Gruppen wurde schon an verschiedenen Substanzen beobachtet (104-106).



Die Halbwertszeit für unverändertes Nitrazepam beträgt etwa 6 1/2 Stunden für die Elimination aus Plasma (42). Der Hauptteil verteilt sich auf extravasale Körperräume, so dass bereits 20 min. nach Gabe von 30 mg $\lambda.v.$ nur noch 0,1 $\mu\text{g/ml}$ vorhanden ist (42). Im Harn liess

-
- (98) J.A.F. de Silva, L.D'Arconte u. J. Kaplan, Curr. Ther. Res. **6**, 115 (1964)
 - (99) D. Cavanagh u. C. S. Condo, Curr. Ther. Res. **6**, 122 (1964)
 - (100) D. E. Schwartz, M. Vecchi, A. Ronco u. K. Kaiser, Arzneim.-Forsch. **16**, 1109 (1966)
 - (101) M. A. Schwartz u. P. Bommer, Fed. Proc. **25**, 532 (1966)
 - (102) M. A. Schwartz, P. Bommer u. F. M. Vane, Arch. Biochem. Biophys. **121**, 508 (1967)
 - (103) D. Robinson, Biochem. J. **68**, 584 (1958)
 - (104) M. London, G. Popovici u. V. Pasat
 - (105) V. Galea u. N. Preda
 - (106) S. Laham, J. P. Farant u. M. Potvin, Vorträge auf dem XXIst. International Congress of Pure and Applied Chemistry, 4.-10. Sept. 1967, Prag

sich Nitrazepam auch nach Anreichern bisher noch nicht sicher nachweisen, während die bekannten Metaboliten um ein Vielfaches konzentrierter als im Plasma vorhanden sind. (42)

Als weiterer Metabolit ist 2-Amino-5-nitro-benzophenon dünn-schichtchromatographisch in extrem kleinen Mengen aus stark eingengtem Harn gefunden worden (42), genaue Daten sind jedoch noch nicht veröffentlicht.

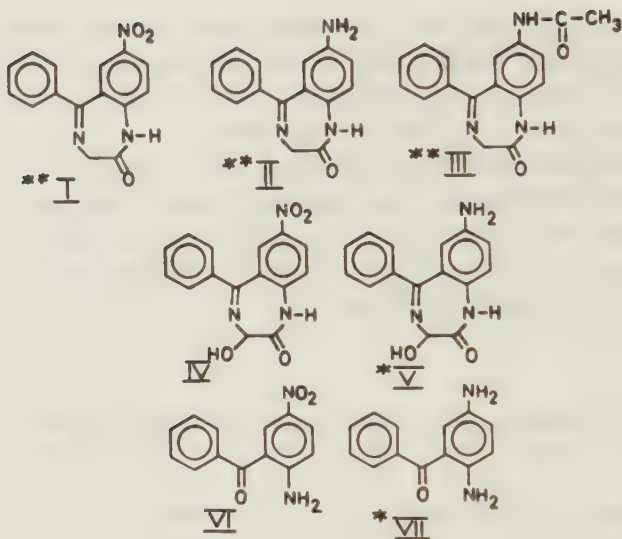
C II Synthese möglicher Nitrazepam-Metaboliten =====

Der nun folgende Teil der Arbeit befasst sich ausschliesslich mit Nitrazepam, da der Metabolismus der drei anderen Benzodiazepine im Menschen als weitgehend abgeklärt gilt.

Folgende Metabolisierungsschritte wurden angenommen :

- 1) Reduktion der Nitro-Gruppe zur Amino-Gruppe
- 2) Acetylierung der Amino-Gruppe
- 3) Hydroxylierung in C₃
- 4) Hydrolyse zu Benzophenonderivaten

Danach lassen sich aus Nitrazepam (I) folgende Modells-substanzen ableiten :



* noch nicht beschrieben

** Wir danken der Firma Hoffmann-La Roche für die Überlassung der Substanzen I, II und III.

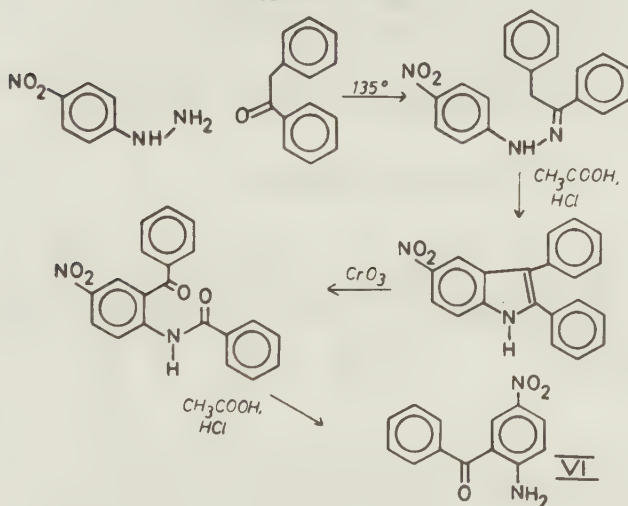
Eine dem "offenen Laktam" des Chlordiazepoxids analoge Verbindung schien durch das Fehlen der N-Oxid-Funktion im sauren Medium instabil zu sein und liess sich nicht isolieren (vergl. 107).

Die Synthese von 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI) durch eine Friedel-Craft-Acylierung mit ZnCl_2 (vergl. 108, 109) gelang nicht, so dass der Umweg über ein Indol-derivat eingeschlagen werden musste, dessen Doppel-

-
- (107) S.C. Bell, T.S. Sulkowski, C. Gochman u. S.J. Childress, *J. Organ. Chem.* **27**, 562 (1962)
 - (108) L.H. Sternbach, E. Reeder, O. Keller u. W. Metlesics, *J. Organ. Chem.* **26**, 4488 (1961)
 - (109) L.H. Sternbach, R.J. Fryer, W. Metlesics, G. Sach u. A. Stempel, *J. Organ. Chem.* **27**, 3781 (1962)
 - (110) K. Schofield u. R.S. Theobald, *J. Chem. Soc.* 1505 (1950)

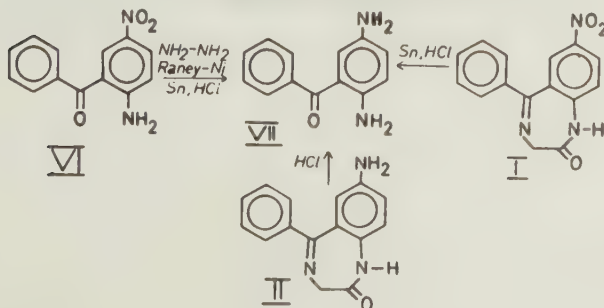
bindung in 2,3-Stellung in guter Ausbeute oxydativ aufgespalten werden konnte (110).

Reaktionsschema I



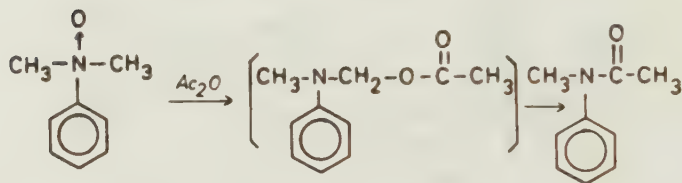
2,5-Diamino-benzophenon (VII) liess sich aus I oder VI durch Erhitzen mit Sn/HCl , durch Reduktion von VI mit gebundenem Wasserstoff ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$ /Raney-Nickel) oder durch saure Hydrolyse von II (7-Amino-Metabolit) darstellen.

Reaktionsschema II



Die OH-Gruppe der Benzodiazepine in 3-Stellung konnte über das N_4 -Oxid mit Essigsäureanhydrid und anschließender Hydrolyse des entstandenen 3-Acetoxy-Derivates eingeführt werden (111). Der Reaktionsmechanismus wird analog der Polonovski-Reaktion gedeutet (112), bei der als Zwischenprodukt ein acyliertes Carbinolamin entsteht (113), das dem 3-Acetoxy-Nitrazepam entspricht.

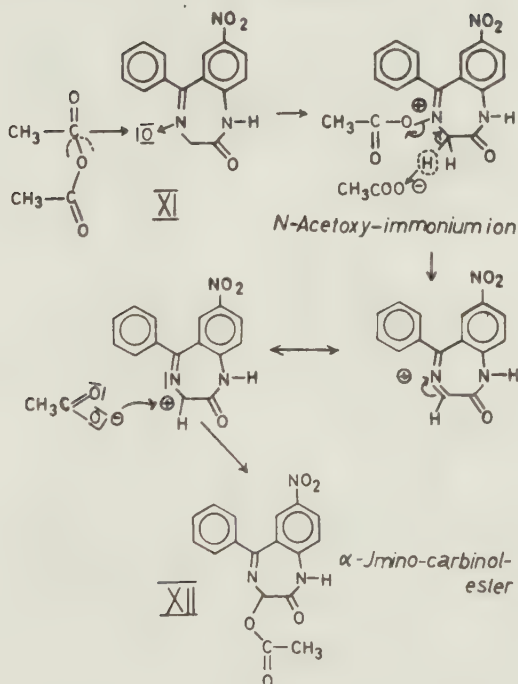
Polonovski-Reaktion



Die Reaktion verlief hier in besseren Ausbeuten, wahrscheinlich da es sich bei Nitrazepam- N_4 -oxid(X) um eine C_3 -H-aktive Verbindung handelt.

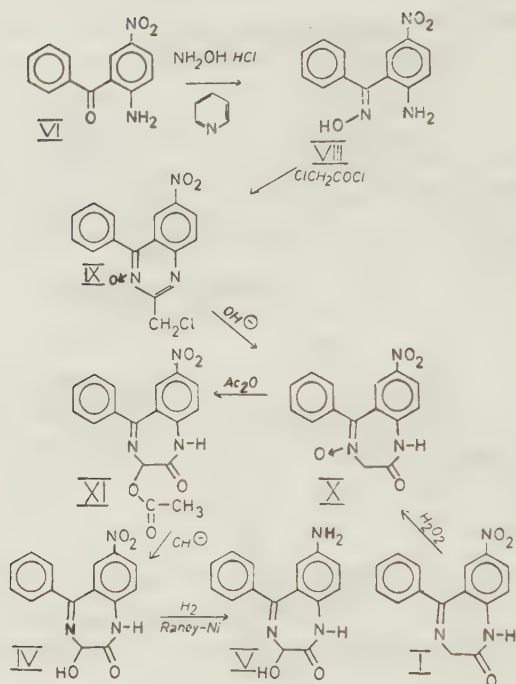
-
- (111) E. Reeder, A. Stempel u. L. H. Sternbach, Chem. Abstr. 60, 13261d (1964)
 (112) S. C. Bell u. S. J. Childress, J. Org. Chem. 27, 1691 (1962)
 (113) R. Huisgen, F. Bayerlein u. W. Heydkamp, Chem. Ber. 92, 3223 (1959)

Reaktionsmechanismus



Da sich Nitrazepam nur in schlechten Ausbeuten mit H_2O_2 zum N_4 -Oxid oxydieren liess, wurde das N_4 -Oxid analog der Chlordiazepoxid-Synthese über das Chinazolin- N_3 -oxid und Ringerweiterung mit Alkali dargestellt (81) (Reaktionsschema III).

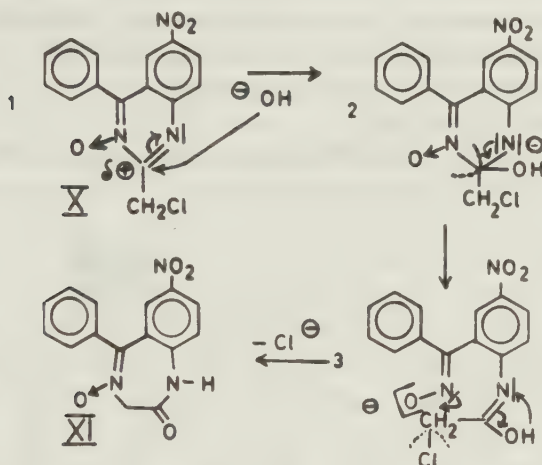
Reaktionsschema III



Bei der Umsetzung von VIII mit Chloracetylchlorid entstand nur wenig gelbes IX und ein grösserer Anteil eines weisslichen Substanzgemisches. Der Reaktionsablauf war sehr komplex, vor allem da als Ausgangsprodukt ein Gemisch von syn- und anti-Oxim eingesetzt wurde. Diese Isomeren steuern die Reaktion verschiedenartig (vergl. 114). IX wurde zur weiteren Umsetzung nicht isoliert, sondern das Gemisch, das vermutlich noch ringoffene Vorstufen enthielt, unter Alkalieinfluss weiter zu X umgesetzt. Der Mecha-

(114) A. Stempel, I. Douvan, E. Reeder u. L. H. Sternbach, J. Organ. Chem. 32, 2417 (1967)

nismus der Ringerweiterung von IX zu X lässt sich folgendermassen deuten (115,116,117) :



1) nucleophiler Angriff am positivierten C_2
 2) Ringöffnung $\text{C}_2\text{-N}_3$
 3) intramolekulare N-Alkylierung unter Cl^- -Abspaltung.
 Beim Auskristallisieren wurde nicht das Nitron X sondern das isomere, noch nicht beschriebene Oxazirinderivat erhalten (vergl. Chlordiazepoxid D I, 1, S. 82), das im UV-Spektrum in Methanol nur ein Maximum bei 290 nm aufwies. Ein Maximum in diesem Bereich wurde 3-Aryl-oxaziridinen zugeschrieben (88). Die Umlagerung hat wahrscheinlich durch Lichteinfluss stattgefunden. Die Verbindung schmolz bei $264\text{--}66^\circ$ und wurde sofort durch Umwandlung in das Nitron wieder fest, um bei $220\text{--}22^\circ$ (Lit.-Fp. $218\text{--}20^\circ$) erneut zu schmelzen (vergl. 118). Weiterhin wurde Jodid zu Jod oxydiert. Der Sauerstoff war also nicht inaktiv, wie es für das Nitronderivat zu erwarten war (119).

(115) G.F. Field, W.J. Zally u. L.H. Sternbach, Tetrahedron Letters 23, 2609 (1966)

(116) A. Stempel, E. Reeder u. L.H. Sternbach, J. Organ. Chem. 30, 4267 (1965)

Das N.M.R.-Spektrum (Abb.21) zeigte eine chemische Verschiebung der N-H- und C₃-Methylenprotonen gegenüber Nitrazepam um ca. 0,4 ppm. nach tieferem Feld (vergl. Abb.14). Die Verbindung war also acider als Nitrazepam und liess sich mit 1n-NaOH aus organischen Lösungsmitteln ausschütteln.

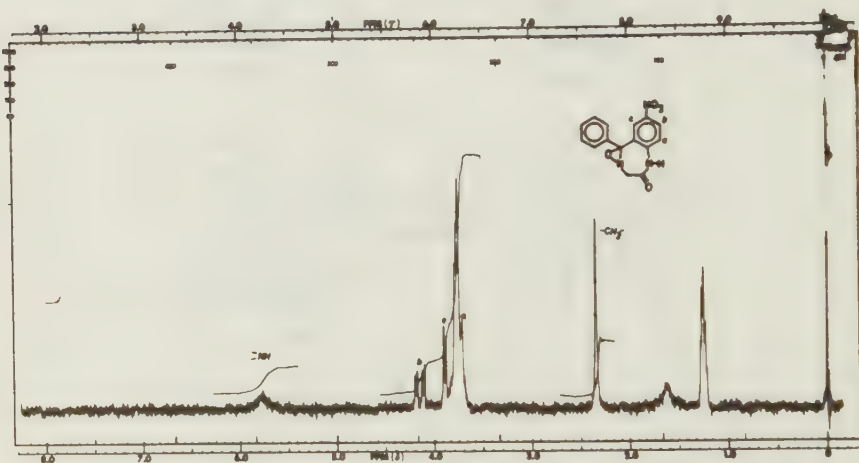


Abb.21 : N.M.R.-Spektrum des Oxaziridins (sweep width 1000 cps)
 N-H:= s 11,5 , (1 H)
 C₃-H:= s 4,70 , (2 H)
 H₂:= dd 8,30 , J=11 und 3 Hz, (1 H)
 arom.H:= m 7,30-7,85 , (7 H)

Auch hier schien das Oxaziridin N-H- und nicht C-H-acid zu sein, wie es schon für das "Laktam" des Chlordiazepoxids nachgewiesen worden war. (s.S.38)
 Der N-H- und der Wasserpeak waren anders als bei

(117) G.F.Field, W.J.Zally u.L.H.Sternbach, J.Am. Chem.Soc. 89, 332 (1967)

(118) L.H.Sternbach, B.A.Koechlin u.E.Reeder, J.Organ. Chem. 27, 1671 (1962)

(119) W.J.Emmons, J.Am.Chem.Soc. 78, 6208 (1956)

Nitrazepam (Abb.14) durch gegenseitigen Protonenaustausch abgeflacht. Der Oxaziridinring übte also einen ähnlichen elektronenziehenden Einfluss wie das isomere Nitron auf das gesamte Molekül aus. Ebenso verlief die Polonovski-Reaktion des Oxaziridins mit Essigsäureanhydrid in gleich hoher Ausbeute, wie es für das isomere Nitron beschrieben worden war (111).

Die Reduktion der Nitrogruppe in guten Ausbeuten zum primären Amin brachte zunächst einige Schwierigkeiten. Sternbach und Mitarb. (81) hydrierten mit Raney-Nickel/ H_2 bei 25° und Atmosphärendruck, gaben jedoch keine Ausbeute und ein relativ niedriges Schmelzintervall ($228-31^\circ$ gegenüber $236-9^\circ$ (118)) für die erhaltene, noch gelbe Substanz an. Beim Nacharbeiten wurde mit käuflichem Raney-Nickel kein Ergebnis erzielt, ebenso verliefen Reduktionsversuche mit Zn/Eisessig, Natriumdithionit in Wasser/Pyridin und NH_2-NH_2 /Raney-Nickel erfolglos. Es wurde daher besonderes Interesse der Aktivität des Raney-Nickels zugewendet. Mit basischem, hochaktivem Katalysator (119) entstand kein primäres Amin, wahrscheinlich traten Dimerisierungen ein. Wurde der Katalysator zwei mal kurz mit 0,1%-Essigsäure gewaschen, zersetzte sich ein Teil der Nickelhydride und die pyrophoren Eigenschaften nahmen ab. Beim Aufbewahren in Äthanol war so behandelter Katalysator sofort nach der Herstellung noch zu aktiv, erst nach etwa 20 Stunden war die Aktivität genügend abgesunken. Bei kleinen Einwaagen waren die Ausbeuten an II immer noch nicht sehr hoch, die Substanz liess sich ausserdem nur schwer durch Umkristallisieren reinigen. Das 7-Amino-3-hydroxy-derivat V dagegen besass bei einem extrem hohen Schmelzpunkt ($>300^\circ$) eine starke Neigung zur Kristallisation und liess sich auch in kleinen Mengen leicht isolieren.

(118) Chem. Abstr. 61, P 13332c (1965)

(119) Organikum, 5. Auflage, VEB Deutscher Verlag d.

Wissenschaften, Leipzig, 1965

C III Analytik der Modellsubstanzen

1. UV-Spektren

Tabelle 5 : Absorptionsmaxima und -minima in Methanol

Substanz	Maxima (nm)	Minima (nm)
I	310, 258	242
II	350, 242	310
III	327, 246	298
IV	305, 260	296, 242
V	350, 242	318
VI	355, 236	287
VII	414, 244	332

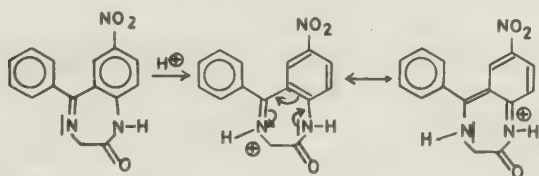
Offensichtlich übt der Substituent in 5-Stellung der Benzophenone bzw. in 7-Stellung der Benzodiazepine einen starken Einfluss auf das UV-Spektrum aus. Mit steigendem Elektronenzug kommt es zu einer hypsochromen Verschiebung der längerwelligeren Bande, die bei den Benzodiazepinen im Gegensatz zu den Benzophenonen charakteristisch schwach ausgebildet ist und als C=N-Bande in Konjugation mit Aromaten gedeutet werden kann (112). Die Bande im kurzwelligen UV wird weniger stark verändert.

Tabelle 6 : Einfluss der Substituenten in 5- bzw. 7-Stellung

Substanz	Substituent in 7-Stellung	Maxima (nm)
II	-NH ₂	350
III	-NHCOCH ₃	327
I	-NO ₂	310
	Substituent in 5-Stellung	
VII	-NH ₂	414
2-Amino-5-chlor-benzophenon	-Cl	381
VI	-NO ₂	355

Das UV-Spektrum gibt also eine gute Möglichkeit zur Differenzierung, nur Hydroxylierung in 3-Stellung der Benzodiazepine übt so gut wie keinen Einfluss aus, so dass sich die Spektren von I und IV und von II und V kaum unterscheiden.

Die Lage der Maxima ist stark pH-abhängig. In HCl lässt sich für die nichtreduzierten Benzodiazepine I und IV eine schwache bathochrome Verschiebung durch Protonierung des N₃ erwarten.



Bei den aromatischen Aminen II und V wird durch Protonierung eine Resonanz des freien Elektronenpaares am Stickstoff mit dem aromatischen System verhindert. Hier findet eine schwache hypsochrome Verschiebung der C=N-Bande statt, während das Spektrum im kurzwelligen UV stark verändert wird. VII löst sich farblos in ln-HCl, wobei die Bande bei 414 nm verschwindet. In verdünnter NaOH wird das Maximum von I durch Halochromie zum sichtbaren Bereich verschoben.

Tabelle 7 : Einfluss der H⁺-Konzentration

Substanz	Lösungsmittel	Maxima (nm)
I	Methanol	310
	0,2n-HCl	330
	0,1n-NaOH	366
V	Methanol	350, 242
	0,1n-HCl	340, 279, 229
VII	Methanol	414, 244
	1n-HCl	260, 250

2. IR-Spektren

Tabelle 8 : Zuordnung der Banden (Lage der Banden in cm^{-1} , gemessen in KBr)

	I	II	III	IV	V	VI	VII
NH ₂ asymm. symm. (aromat. Amin)		3450 3350			3410 3320	3460 3340	3380 3320 3230
OH-Valenz				3430	3260		
Amid-I Amid-II	1700	1680	1680 1550	1710	1700		
Carbonyl						1630	1640
NO ₂ asymm. symm.	1540 1335			1540 1335		1565 1335	
C-N-Valenz aromat. Amin					1315	über- deckt	1300
OH-Deformation				1130	1135		
monosubst. Aromat	695 745	700 745	695 740	700 745	695 730	700 755	695 755

Die IR-Spektren erlauben eine genaue Differenzierung der Substanzen, vor allem lässt sich im Gegensatz zum UV-Spektrum Hydroxylierung in 3-Stellung sofort erkennen. Die OH-Deformationsschwingung der sekundären Alkohole (120) IV und V liegt bei 1130 cm^{-1} , die OH-Valenzschwingung von IV bei 3430 cm^{-1} . Wie der extrem hohe Schmelzpunkt von V schon andeutet, wird hier die OH-Valenzschwingung durch ausgeprägte H-Brückenbildung zu kleineren Wellenzahlen verschoben (3260 cm^{-1}). Auch die weiteren Substituenten NO₂ und NH₂ geben starke, leicht erkennbare Banden.

Charakteristisch für die Benzodiazepine, über deren IR-Spektren bereits in mehreren Arbeiten der Gruppen um

(120) L.J.Bellamy, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, Verlag v. Dr.D.Steinkopff, Darmstadt, 1955

Sternbach und Bell berichtet wurde, sind die Amid-I-Bande bei etwa 1700 cm^{-1} , das Fehlen der Amid-II-Bande und die Banden bei 700 und 740 cm^{-1} für den unsubstituierten 5-Phenyl-ring. Die Amid-I-Bande ist vor allem bei III durch 7-Acetylierung mit weiteren Banden überlagert, das auch eine Amid-II-Bande auf Grund der trans-Form des 7-Acetylamids besitzt. Die Carbonylbanden der Benzophenone sind durch Chelation mit der 2-Amino-Gruppe aus dem normalen Bereich zu kleineren Wellenzahlen verschoben.

3. Bratton-Marshall-Reaktion einiger Modellsubstanzen

Rieder (42) gab eine Methode an, nach der I, II und III nebeneinander bestimmt werden können. Er reduzierte I mit Natriumdithionit bei pH 10 und diazotierte und kuppelte das entstandene II nach Bratton-Marshall. Natriumdithionit hat gegenüber anderen Reduktionsmitteln den Vorteil, im sauren Medium auf den Azofarbstoff nicht reduzierend zu wirken und damit die Reaktion zu stören. Für die zu erwartenden Konzentrationen im biologischen Material, besonders im Harn, waren die beim Nacharbeiten gefundenen Extinktionswerte zu gering. So ergaben nach dem angegebenen Extraktionsverfahren (42) 4 g/ml zugesetztes I aus 5 ml Harn nur eine Extinktion von $0,30$ (vergl. Tabelle 4, S.25), da die Reduktion offensichtlich nicht quantitativ erfolgte. Der Versuch, II nach dieser Methode präparativ aus I zu erhalten, brachte kein Ergebnis (300 mg I in 10 ml Pyridin und 10 ml Wasser mit 200 mg MgO und 350 mg Natriumdithionit eine Stunde bei 50° halten). Zur Erfassung sehr kleiner Mengen I schien die Bestimmung über das Hydrolyseprodukt VI eher geeignet zu sein.

Pribilla (43) erhitzte I in Sn/HCl und erzwang die Diazotierung des von ihm vermuteten VII mit Nitro-

syl-Schwefelsäure. Das Verfahren ist für quantitative analytische Messungen schlecht reproduzierbar. VII, durch salzsaure Hydrolyse aus II entstanden, diazotierte und kuppelte nach der in B IV ausgearbeiteten Methode nur geringfügig (Abb.22). die Hydrolyse des 7-Ringes von II zu VII dauerte etwas länger als bei den anderen Benzodiazepinen, wie UV-spektrophotometrische Untersuchungen ergaben. Nach 10 min. langem Erhitzen am Rückflusskühler in 10%-HCl war die Reaktion erst zu etwa 75% abgelaufen, nach 20 min. zu etwa 85%. Die Identität des entstandenen Hydrolyseproduktes mit VII wurde durch das UV-Spektrum in CHCl_3 (Maximum bei 413 nm) und in 0,1n-HCl (Maxima bei 260 und 250,4 nm) und dünnschichtchromatographisch bestätigt.

VII liess sich von VI quantitativ durch Ausschütteln aus organischen Lösungsmitteln mit 10%-HCl trennen (s. Schema im Praktischen Teil S.100). Zur Extraktion erwies sich Äther günstiger als CHCl_3 , da dieses durch häufig vorhandene Verunreinigungen die Lage der UV-Maxima von VII besonders in geringen Konzentrationen verändern kann und so Messungen erschwert.

Auch die Bestimmung von II nach Rieder (42) ergab für Harnanalysen noch zu geringe Extinktionen, so dass das Verfahren modifiziert werden musste. Der Einfluss der Säurestärke auf die Farbintensität des Azofarbstoffes machte sich hier nicht so stark bemerkbar wie bei VI (vergl. Abb. 7, S.22), so dass die Reaktion in 0,1n-HCl durchgeführt werden konnte, vor allem, da die Reextraktion aus organischen Lösungsmitteln bereits mit 0,1n-HCl annähernd quantitativ erfolgte.

Nach der im Praktischen Teil gegebenen Arbeitsvorschrift wurden Eichkurven hergestellt (s. Abb.22 u. Tab.9). Bei Extraktionen aus Wasser bzw. Harn wurde von 30 ml ausgegangen, um die Nachweisgrenze möglichst niedrig zu halten.

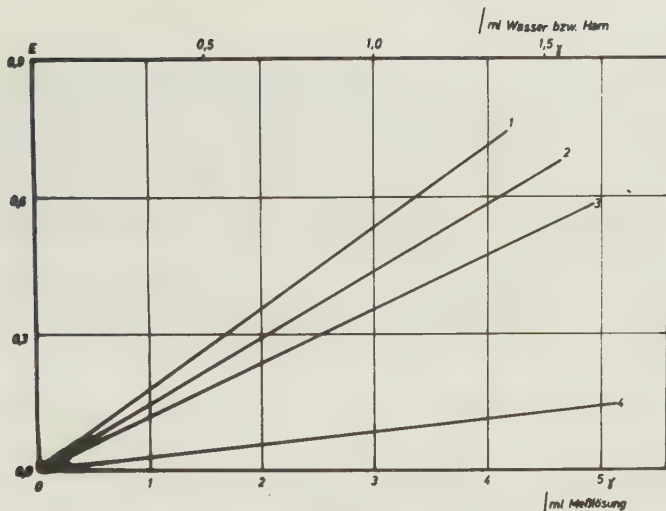


Abb. 22 : Eichkurven für II nach Bratton-Marshall-Reaktion : 1) II 2) II mit Extraktion aus Wasser 3) II mit Extraktion aus Harn 4) II nach Methode B III, 4 (Hydrolyse in 10%-HCl)

Tabelle 9 : Extinktionen von II bei 3 γ /ml Lösung nach Bratton-Marshall-Reaktion bei 550 nm

	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	E	Extinktionsverlust durch Extraktion
ohne Extraktion	1765	0,53	
mit Extraktion aus Wasser		0,44	17%
mit Extraktion aus Harn		0,355	33%
mit Hydrolyse in 10%-HCl nach BIII, 4		0,085	(bei 544 nm)

Aus Harn waren noch 0,15 γ /ml quantitativ erfassbar ($E=0,05$). V ergab dieselben Reaktionen nach Bratton-Marshall (Maximum bei 550nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%}=1307$). Nach 20 min. Hydrolyse in 10%-HCl wurde analog ein Maximum bei 544 nm nach Bratton-Marshall-Reaktion mit 1/5 der Intensität wie ohne Hydrolyse gefunden.

4. Dünnschichtchromatographie

Zum raschen und empfindlichen Nachweis der Substanzen

I - VII wurde die Dünnschichtchromatographie herangezogen. Voruntersuchungen ergaben, dass sich mit Kieselgel GF 254 (Merck) als Sorptionsschicht das Trennproblem am besten lösen liess. Von Bedeutung für den Trennvorgang war weiterhin eine etwa 30-minütige Kamersättigung vor dem Entwickeln.

In der folgenden Tabelle sind die RF-Werte in verschiedenen Fliessmittelsystemen verzeichnet. Die Werte der Fliessmittel 1 bis 3 stellen Mittelwerte aus 5 - 10 Bestimmungen dar.

Tabelle 10 : RF-Werte

Modellsubstanzen								
Fliessmittel (Fl.)	Zeichen	I	II	III	IV	V	VI	VII
Toluol 50 Aceton 50 konz.NH ₃ 1	Fl.1	0,52	0,32	0,27	0,23	0,21	0,70	0,55
Äthylacet. 70 n-Propanol 30 Diäthylamin 1	Fl.2	0,70	0,59	0,56	0,32	0,27	0,79	0,72
Methanol 10 Äthylenchlorid 90, konz.NH ₃ 1	Fl.3	0,54	0,28	0,19	0,26	0,18	0,75	0,65
Methanol 50 Aceton 50 Triäthanolamin 1	Fl.4	0,82	0,76	0,77	0,75	0,62	0,80	0,72
Chloroform 9 Aceton 1	Fl.5	0,18	0,06	0,03	0,08	0,03	0,65	0,25
Benzol 99 Methanol 1	Fl.6	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,08

Mit Fl.1 bis 3 lässt sich also jedes Substanzgemisch auftrennen.

Auf den ^{bei} 254 nm im UV-Licht durch Fluoreszenzindikator gelbgrün leuchtenden Platten waren die Substanzen ent-

weder durch Fluoreszenzlöschung oder durch Eigenfluoreszenz in Mengen über 1 μ g erkennbar. Im langwelligeren UV bei 356 nm traten vor allem VI und VII deutlich hervor, die im sichtbaren Bereich gelbe Flecken lieferten. VII wurde beim Stehen der Platten an der Luft bald braun und lieferte dann bei Detektion nach Bratton-Marshall stark veränderte, meist grüne Farben.

Tabelle 11 : Farben der Substanzflecken unter der UV-Lampe

	I	II	III	IV	V	VI	VII
bei 254 nm	violett	violett	violett	violett	violett	grün	violett
bei 356 nm	-	etwas braun	-	-	etwas braun	olivgrün	hellbraun

Zur Detektion wurde das Verfahren von Rieder (42) benutzt, der die Flecken mit Hilfe der Bratton-Marshall-Reaktion anfärbte. Durch Hydrolyse mit 2n-H₂SO₄ 15 min. bei 130° und durch Reduktion mit Natriumthionit auf der Platte konnten alle Substanzen angefärbt werden.

Tabelle 12 : Farbe der Substanzflecken nach Bratton-Marshall-Reaktion

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Bratton-Marshall	rötlich	violett	gelblich	rötlich	violett	rot	violett
mit Hydrolyse	rötlich	violett	violett	rötlich	violett	rot	violett
mit Reduktion	violett	violett	gelblich	violett	violett	rot	violett

5. Extraktionsverfahren

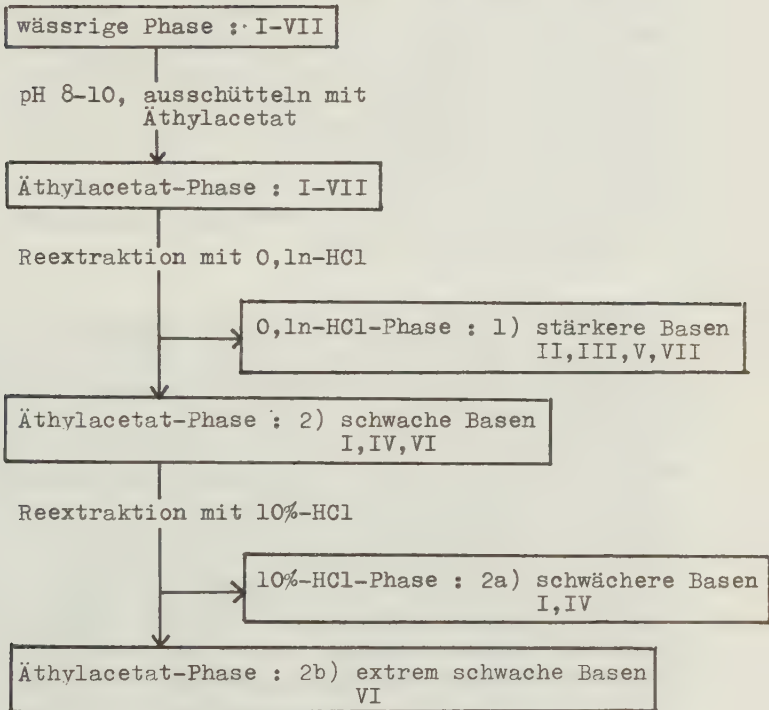
Um die Aussagekraft der Dünnschichtchromatographie zu erhöhen, war es wünschenswert, ein spezifisches Extraktionsverfahren zu erarbeiten, das die Modellsubstanzen in verschiedene Phasen aufteilt. Auf Grund ihrer unterschiedlichen Basizitäten liessen sich folgende Gruppen aufstellen :

- 1) Phase der stärkeren Basen (7-Amino-nitrazepam (II),
7-Amino-3-hydroxy-nitrazepam (V),
7-Acetamido-nitrazepam (III),
2,5-Diamino-benzophenon (VII))
- 2) Phase der schwachen Basen
 - 2a) schwächere Basen (Nitrazepam (I),
3-Hydroxy-nitrazepam (IV))
 - 2b) extrem schwache Basen (2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI))

Die stärkeren Basen konnten mit 0,1n-HCl aus organischen Lösungsmitteln (Äthylacetat) ausgeschüttelt werden, die schwächeren Basen erst mit 10%-HCl (vergl. Abb.8, S.24).

Die extrem schwache Base VI verblieb quantitativ in der organischen Phase. Zur Extraktion aus wässrigem Milieu (z.B. Harn) bei pH 8-10 wurde Äthylacetat verwendet. Mit diesem Lösungsmittel liessen sich sämtliche Substanzen erfassen.

Extraktionsschema



C IV Untersuchungen an Harnproben

=====

1. Voruntersuchungen mit Hilfe der Papierchromatographie

Untersuchungen mit Hilfe des Fließmittelsystems nach Jatzkewitz (121,122) an Harnproben von Patienten, die Nitrazepam (I) eingenommen hatten, ergaben,

-
- (121) H. Jatzkewitz, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.
292, 94 (1953)
(122) " u. U. Linz, " Z. Physiol. Chem.
305, 53 (1956)

dass unverändertes I, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Mengen ausgeschieden wurde. Es waren dagegen nach Extraktion bei pH 8-10 mit Äthylacetat zwei deutlich Bratton-Marshall-positive Flecken bei RF 0,46 und 0,28 und weitere z.T. sehr schwache Substanzflecken sichtbar. Die weiteren Untersuchungen wurden mit der Dünnschichtchromatographie durchgeführt, die bessere Trennmöglichkeiten bei geringerem Zeitaufwand bot.

2. Nachweis der Metaboliten II, III und VI

a. Extraktion bei verschiedenen pH-Werten

Je 40 ml N33 (= 3 Stunden nach I-Einnahme) wurden bei pH 4, pH 8-10 und im stark alkalischen Medium extrahiert, die in Methanol gelösten Rückstände aufgetragen und mit Fl.1 bis 3 entwickelt. Die Vergleichssubstanzen I bis VII wurden ebenfalls aufgetragen. Die bei verschiedenen pH-Werten gewonnenen Extrakte unterschieden sich nur geringfügig, lediglich bei pH 4 störte die grössere Menge harnpflichtiger Anteile, die beim Entwickeln mit Fl.1 jedoch hauptsächlich am Startpunkt zurückblieben. Mit Fl.1 erhielt man ausserdem die besten Trenneffekte, es waren etwa 14 Substanzflecke im kurzwelligen UV bei 254 nm sichtbar. VII konnte nicht festgestellt werden, ebenso war die Anwesenheit von I sehr unsicher. Wegen der grossen Zahl der Substanzflecken waren auch die Flecken in Höhe der Rf-Werte der anderen Vergleichssubstanzen nur schwer deutbar. In Höhe des Rf-Wertes von VI war unter der UV-Lampe keine Substanz sichtbar, erst bei Detektion nach Bratton-Marshall erschienen schwach rote Flecken in allen drei Extraktionsphasen. Die Konzentration von VI dürfte also kleiner als 0,5g/50 ml Harn gewesen sein.

b. Zeitlicher Verlauf der Nitrozeam-Ausscheidung

Je 50 ml der Harnproben N31 bis 48 wurden mit Äthylacetat extrahiert. Die nicht aufgetragenen Extrakt-rückstände von N33 (s.a., S.62) wurden in Äthylacetat aufgenommen und in die Phase der stärkeren Basen (N33 I) und die Phase der schwachen Basen (N33 II) aufgetrennt. Die Rückstände wurden zusammen mit den Vergleichssubstanzen I bis VII mit Fl.1 dünn-schicht-chromatographiert (Abb.23).

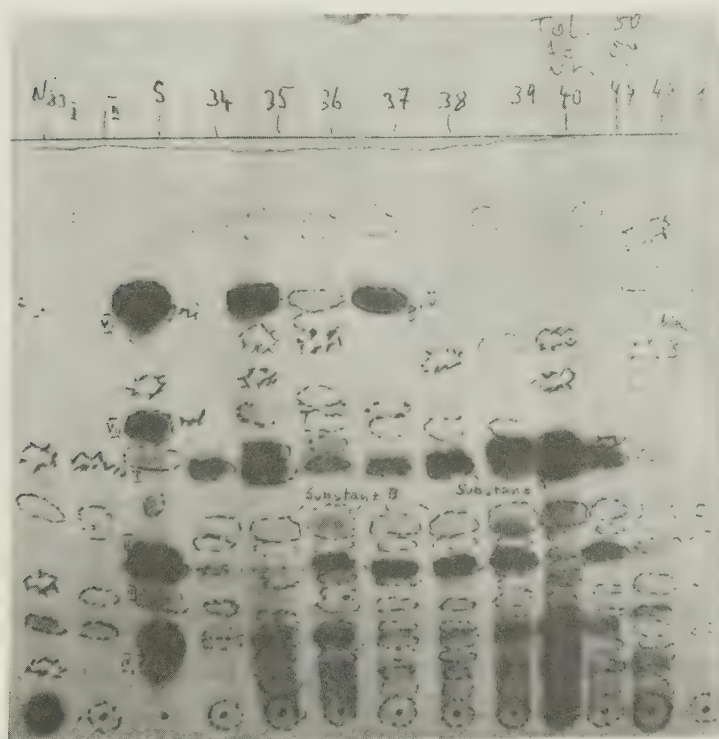


Abb.23 : Dünn-schicht-chromatogramm nach Entwickeln mit Fl.1 und Detektion nach Bratton-Marshall (positiv : Schwarz), S : Vergleichssubstanzen

Bei einem entsprechend aufgearbeiteten Leerharn (N 8) waren so gut wie keine Substanzen sichtbar. N 33_I und N 33_{II} enthielten noch relativ wenig Abbauprodukte, deren Zahl über N 34 bis N 36 rasch auf etwa 20 im kurzwelligen UV bei 254 nm unterscheidbare Substanzflecken anstieg. Besonders auffällig waren zwei Substanzen (A, B), die in grösserer Konzentration vorhanden waren, jedoch mit I bis VII nicht übereinstimmten.

Tabelle 13 : Kennzeichen der Substanzen A und B

	Substanz A	Substanz B
Farbe im Tageslicht	gelb	farblos
Farbe im UV bei 254 nm	hellbraun	weissblau
Fluoreszenz in Methanol	grünlich	-
Bratton-Marshall-Reaktion	rot	negativ
Verteilung beim Schütteln in Äthylacetat und 0,1n-HCl	in 0,1n-HCl	in Äthyl- acetat
Rf-Werte in Fl.1	0,48	0,42
Fl.2	0,53	0,55
Fl.3	0,65	0,43

Im kurz- und langwelligen UV grün fluoreszierende, im RF-Wert mit VI übereinstimmende Flecken waren in den Extrakten N 35 bis 37 sichtbar. Sie traten beim Ansprühen nach Bratton-Marshall in dem für VI charakteristischen Rot hervor, besonders in N 35 und 37 (nach 9 und 15 Stunden I-Einnahme), ganz schwach nur noch in N 38 und 39. Die Zahl der Bratton-Marshall-positiven Flecken nahm stetig bis N 40 zu, ebenso deren Konzentration. Das ist besonders deutlich an den stärker werdenden Flecken in Höhe der Rf-Werte von II und etwas schwächer von V zu sehen.

Für die Substanzflecken in Höhe des Rf-Wertes von III liess sich dieser Konzentrationsanstieg bis 45 Stunden nach I-Einnahme etwas schwerer erkennen, da III Bratton-Marshall-negativ reagierte und nur im kurzwelligen UV-Licht beurteilt werden konnte. Unverändertes I war nicht sicher feststellbar.

c. Anreicherung von II, III und VI

Der nicht aufgetragene Anteil der Extraktückstände N33 bis 48 wurde in Äthylacetat aufgenommen und in die Phase der stärkeren und die der schwachen Basen aufgetrennt. Die Rückstände wurden in Fl.1 dünn-schicht - chromatografiert.

Der Metabolit in Höhe des Rf-Wertes von VI blieb erwartungsgemäß in der ersten Extraktionsphase (Phase der schwachen Basen), während II und III hauptsächlich in der Phase der stärkeren Basen zu finden waren.

d. Zonenverfahren zur spezifischen Auftrennung

Das vorstehend beschriebene Chromatogramm (s.c.) wurde

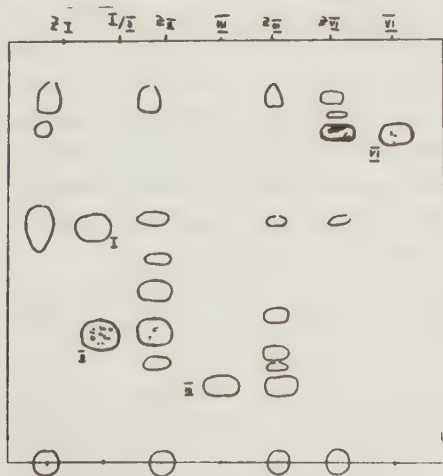


Abb. 24 : Dünnschichtchromatogramm der Zonen (Z) mit Vergleichssubstanzen nach Entwicklung mit Fl.3 und Detektion nach Bratton-Marshall (positiv : schwarz)

in Zonen aufgeteilt, die den RF-Werten von I bis III und VI entsprachen. Die Zonen wurden von der Platte abgeschabt und mit 3 ml Methanol eluiert, filtriert und im Wasserbad eingedampft. Die Rückstände wurden neben den Vergleichssubstanzen mit Fl.3 chromatographiert.

Es liessen sich nochmals mehrere Substanzen auftrennen. So angereichert war auch in Höhe des RF-Wertes von I ein Substanzfleck sichtbar, der wie I im kurzwelligen UV bei 254 nm violett erschien und sich nach Bratton-Marshall schwach rosa anfärbte. Deutlich sichtbar waren die Flecken bei II, III und VI, die nach Bratton-Marshall die charakteristischen Färbungen ergaben (II : violett, III : gelblich, VI : rot). IV und V waren trotz der starken Anreicherung nicht sicher feststellbar, eine nur schwache Färbung nach Bratton-Marshall war sichtbar.

e. UV-Spektren

Nach einem im Praktischen Teil angeführten Aufbereitungsverfahren, bei dem im Prinzip die Auftrennung in Substanzgruppen durch Extraktion mit dem chromatographischen Zonenverfahren kombiniert wurde, liessen sich methanolische Lösungen von II, III und VI erhalten. Die Lösungen wurden von 400-220 nm ausgemessen und mit den Spektren der Modellsubstanzen II, III und VI verglichen (Abb.25 bis 27).

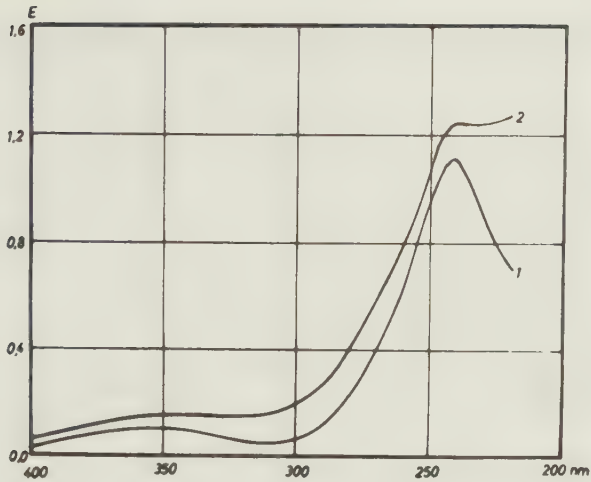


Abb. 25 : 1) UV-Spektrum von II in Methanol
2) UV-Spektrum von II in Methanol, isoliert aus Harn

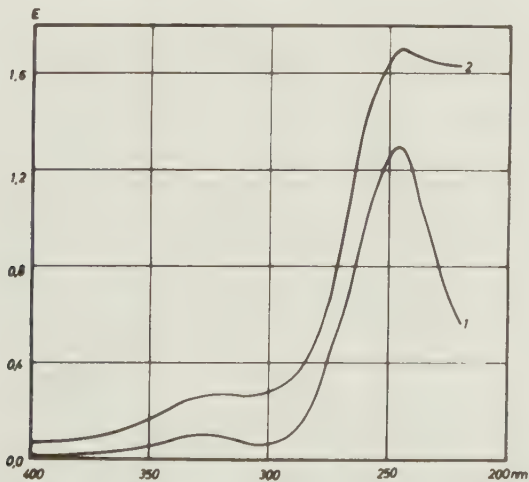


Abb. 26 : 1) UV-Spektrum von III in Methanol
2) UV-Spektrum von III in Methanol, isoliert aus Harn

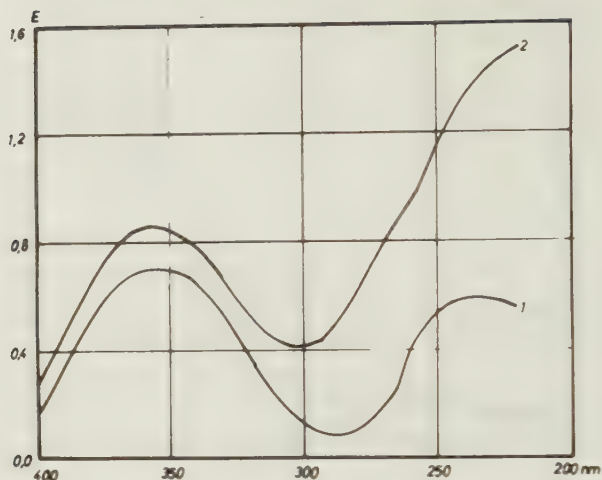


Abb.27 : 1) UV-Spektrum von VI in Methanol
2) UV-Spektrum von VI in Methanol, isoliert aus Harn

VI wurde bereits nach der ersten chromatographischen Trennung in 3 ml Methanol ausgemessen, da kaum störende Substanzflecken zu sehen waren, dann erneut aufgetragen und wie beschrieben behandelt. Die Vergleichsspektren wurden mit einer Lösung von 1 mg Substanz in 50 ml Methanol hergestellt. Die gefundenen Spektren stimmten recht gut überein, wurden jedoch mit abnehmender Wellenlänge in zunehmendem Masse gestört. III schien II mengenmässig etwas zu überwiegen. Die für (VI) aus Harn gefundene Extinktion $E_{355\text{nm}}=1,73$ entsprach etwa 20 $\mu\text{g/ml}$, das sind bei 3 ml Kessllösung 60 μg , die aus 250 ml Harn N 36/37 isoliert werden konnten ($=0,24 \mu\text{g/ml}$ Harn). Nach erneuter chromatographischer Auftrennung war ein grosser Teil der Substanz wahrscheinlich durch ungenügende Eluierung der abgeschabten Kieselgelschicht verloren gegangen ($E_{355\text{nm}}=0,265$ für VI). Die Ergebnisse für II und III liessen sich daher quantitativ nur unsicher auswerten.

f. Quantitative Bratton-Marshall-Reaktion nach J III,3

Nach den vorliegenden Ergebnissen erschien es schwierig, eine selektive quantitative Methode anzuwenden. Es war jedoch möglich, nach der in C III,3 ausgearbeiteten Methode den Anteil der Metaboliten zu bestimmen, deren NO_2 -Gruppe zur NH_2 -Gruppe reduziert worden war und die daher im Gegensatz zu VI mit 0,1n-HCl reextrahiert werden konnten und sich diazotieren und kuppeln ließen. Die Gesamtmenge der erfassten Substanzen wurde auf II bezogen. Jeweils 30 ml N 33 bis 48 wurden bestimmt und gegen Leerharn N 8 ausgemessen.

Tabelle 14 : Konzentrationen von Metaboliten mit NH_2 -Gruppe in 7-Stellung nach 50 mg I-Einnahme am 29.5. um 9⁰⁰.

Harn	Menge (ml)	Zeit	E bei 550nm	Konz. (γ/ml)	Ausscheidung gesamt (γ)	γ/stunde
N 33	200	29.5 ⁰⁰ 9-12 ⁰⁰	0,13	0,36	72	24
N 34	920	12-15 ⁰⁰	0,05	0,14	129	43
N 35	300	15-18 ⁰⁰	0,275	0,78	234	77
N 36	120	18-21 ⁰⁰	0,20	0,57	68	23
N 37	200	21-24 ⁰⁰	0,145	0,41	82	27
N 38	400	30.5 ⁰⁰ 0-6 ⁰⁰	0,28	0,79	316	53
N 39	520	6-18 ⁰⁰	0,57	1,60	823	69
N 40	150	30.-31.5 ⁰⁰ 18-6 ⁰⁰	0,71	2,00	300	25
N 47	1000	6-18 ⁰⁰	0,205	0,58	580	48
N 48	330	31.5.- 1.6. 18-6 ⁰⁰	0,07	0,2	66	5

In 69 Stunden wurden etwa 2,7 mg, bezogen auf II, ausgeschieden (etwa 6% der eingenommenen Menge). Bei stärkerer Diurese wurde mehr Substanz ausgeschieden, das bedeutet dass ein Teil der Substanzen bei geringer Diurese rückresorbiert wurde. Auffällig war die damit verbundene Ausscheidungsverminderung nachts. Die grösste Ausscheidungsrate fand sich erst etwa 24 Stunden nach I-Einnahme. Bei toxikologischen Analysen muss also beachtet werden, dass die zur Identifizierung im Harn dienenden Metaboliten II und III in den ersten Stunden nach I-Einnahme nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind. Die vorstehenden Untersuchungen wurden an den über längere Zeit gelagerten Harnproben N 33 bis 48 vorgenommen. Der Nachweis einer Nitrazepam-Intoxikation gelang auch noch nach einem Jahr Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

6. Bestätigung der Ergebnisse (Harn Th 1 bis 4)

Die aus dem gelagerten Harn (N 33 bis 48) erhaltenen Ergebnisse wurden mit Untersuchungen an den sofort extrahierten Harnproben Th 1 bis 4 verglichen. Dünnschichtchromatographisch liess sich nachweisen, dass die Zahl der gefundenen Substanzflecken etwas kleiner war als in lange gelagertem Harn und vor allem die Substanzen A und B nicht vorhanden waren. Dadurch trat in der Phase nach Reextraktion aus Äthylacetat in 0,1n-HCl (Phase der stärkeren Basen) II als mengenmässig bei weitem überwiegende Bratton-Marshall-positive Substanz hervor. Die quantitative Bestimmung nach C III,3 aus 30 ml Harn ergab für Th 1 $E_{551\text{ nm}}=0,42$ ($=1,18\gamma/\text{ml Harn} = 2,04\text{ mg II}/24\text{ Stunden}$) und für Th 2 $E_{551\text{ nm}}=0,37$ ($=1,06\gamma/\text{ml Harn} = 2,07\text{ mg II}/24\text{ Stunden}$). Es wurden also bei täglicher Gabe von 40 mg I etwa 5% in Form des Metaboliten II

im Harn ausgeschieden. Dieses Ergebnis korrespondierte gut mit den Werten, die aus den Harnproben N 33 bis 48 erhalten worden waren.

3. Nachweis von unverändertem I und dem Metaboliten V

a. Dünnschichtchromatographie

Um eventuell vorhandenes I und V nachzuweisen, wurden 800 ml Th 2 extrahiert, weil diese Proben die höchsten Konzentrationen erwarten liessen. Die Extrakte wurden in Phasen mit schwachen Basen (Th 2,I) und

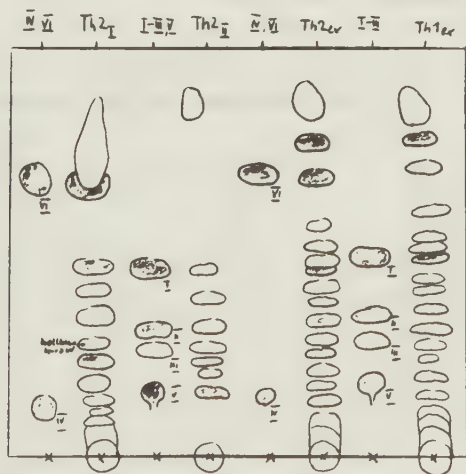


Abb. 28 : Dünnschichtchromatogramm nach Entwickeln mit Fl.1 und Detektion nach Bratton-Marshall mit Reduktion (positiv : schwarz)
Th.1 und 2_{ex}: fermentative Aufarbeitung mit "Ketodase" nach quantitativer Extraktion (s.u.)

stärkeren Basen (Th 2,II) getrennt. Zusammen mit den Vergleichssubstanzen I bis VII wurde in Fl.1 bis 3 dünnschichtchromatographiert (Abb.28).

Bei Detektion nach Bratton-Marshall mit Reduktion fanden sich in Höhe der R_f -Werte von I in der Phase der schwächeren Basen und von V in der Phase der stärkeren Basen violette Substanzflecken.

b. Zonenverfahren zur spezifischen Auftrennung

Von einem weiteren Chromatogramm (s. Abb. 33) wurden die Flecken der Zonen von I und V vor der Detektion abgeschabt (ZI und ZV) und in Fl.4 neben Vergleichssubstanzen chromatographiert. Ebenfalls wurden die restlichen Rückstände von Th.2I und II in Methanol gelöst aufgetragen (Abb. 26).

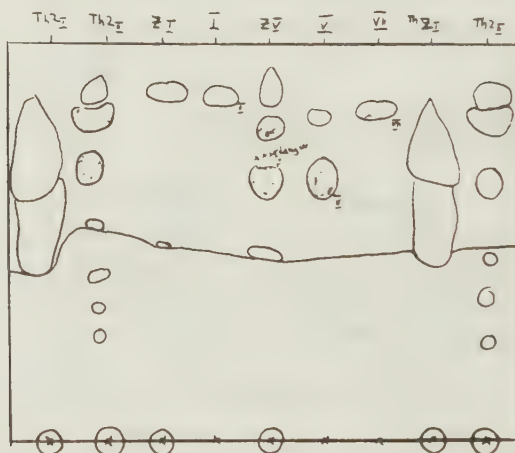


Abb. 29 : Dünnschichtchromatogramm nach Entwickeln mit Fl.4 und Detektion nach Bratton-Marshall (positiv : schwarz)

Auch hier stimmten die R_f -Werte und das Verhalten bei Bratton-Marshall-Reaktion mit den Vergleichssubstanzen überein. Das Fließmittelsystem Fl.4 ent-

mischte sich offensichtlich, lieferte aber im oberen Bereich des Chromatogramms gute Trenneffekte. Vor allem liess sich auch hier V von II und III trennen, deren Substanzflecken sich überlagerten. Zur Aufnahme von UV-Spektren waren I und V noch zu wenig angereichert.

c. UV-Spektren

Insgesamt 3,5 l der Harn e Th 1 bis 4 wurden nach dem im Praktischen Teil angegebenen Verfahren aufgearbeitet und Messlösungen hergestellt. Die Lösungen wurden von 400-220 nm ausgemessen und mit I und V verglichen (Abb.30 und 31).

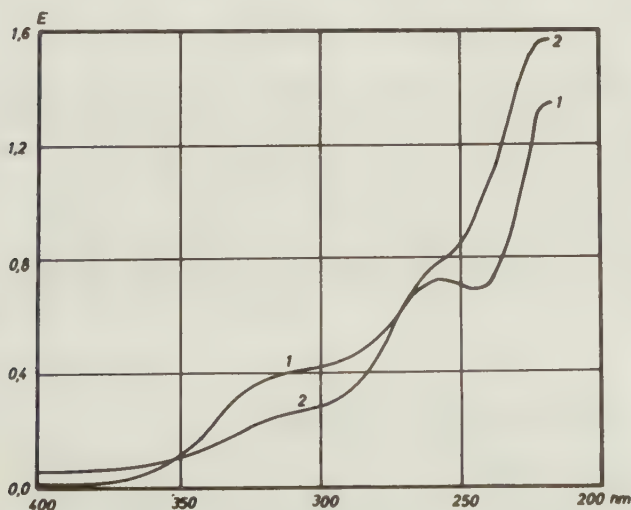


Abb. 30 : 1) UV-Spektrum von I in Methanol
 2) UV-Spektrum von I in Methanol, aus Harn isoliert

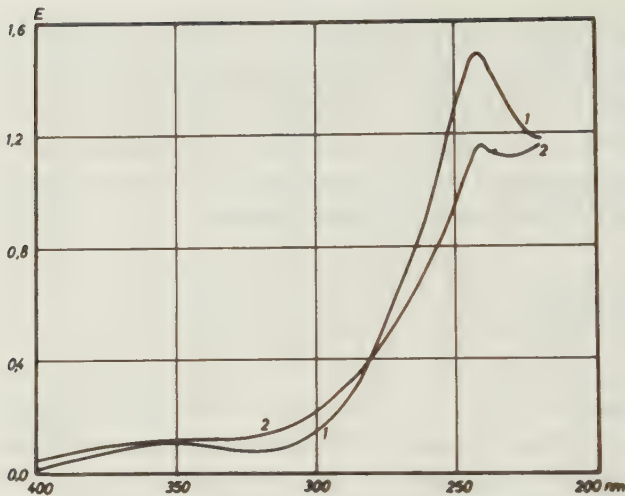


Abb. 31 : 1) UV-Spektrum von V in Methanol
2) UV-Spektrum von V in Methanol, aus Harn isoliert

Die erhaltenen Spektren stimmen recht gut mit den Vergleichsspektren überein, waren jedoch, wie schon bei den anderen Spektren beobachtet worden war, im kurzwelligen UV-Bereich (besonders bei I) durch Fremddabsorption gestört. Die Substanzen I und V dürften damit als nachgewiesen angesehen werden, lagen jedoch im Harn in extrem kleiner Konzentration vor.

1. Nachweis polarer Konjugate

a. Allgemeines

Die Bindung lipophiler körperfremder Substanzen zu polaren Konjugaten und damit die Entgiftung durch schnellere Ausscheidung ist ein häufig beobachteter Metabolisierungsschritt (123), der daher neben Oxy-

dation, Reduktion und Hydrolyse als grundlegende Reaktion anzusehen ist. Während für Chlordiazepoxid, Diazepam und Oxazepam bereits konjugierte Metaboliten in Form von Glucuroniden nachgewiesen worden waren, lagen für Nitrazepam keine derartigen Untersuchungen vor. Besonders für die Derivate IV und V liess sich auf Grund der 3-Hydroxy-Gruppe erwarten, dass sie teilweise als Konjugate vorlagen.

b. Fermentative Aufarbeitung mit Ketodase ^x

Zur Spaltung der β -Glucuronide diente Ketodase, mit der die Harnproben bei pH 4,6 und 48°C 20 Stunden inkubiert wurden (124). Dadurch wurde die bei saurer Hydrolyse der Konjugate mit HCl gleichzeitig auftretende Spaltung des 7-Ringes der Benzodiazepine weitgehend verhindert.

Die Harne N 34, N 35/37 und N 38-48 wurden extrahiert und anschliessend inkubiert. Nach erneuter Extraktion waren dünnschichtchromatographisch bis zu 7 neue Substanzflecken erkennbar (Abb.32), die jedoch in so geringer Menge vorhanden waren, dass eine genaue Identifizierung nicht möglich war. Beim Ansprühen der Platte nach Bratton-Marshall zeigte sich in Höhe der Rf-Werte von IV und V eine minimale Färbung, die anderen Substanzflecken reagierten negativ. Die Konzentration

-
- x) acetatgepufferte, auf pH 5 eingestellte β -Glucuronidase mit 5000 Fishman-Einheiten pro ml, Hersteller Warner-Chilcott, Morris Plains, N.J., Vertrieb in Deutschland: Cödecke u. Co, Chem.Fabrik AG Berlin
- (123) K.-H.Beyer, Z.analyt.Chem. 212,139(1965)
- (124) K.-H.Beyer u.D.Klinge, Z.klin.Chem. 2,126(1964)

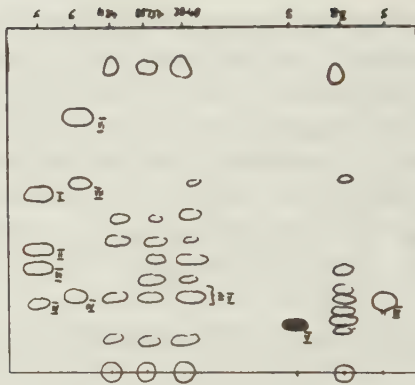


Abb. 32 : Dünnschichtchromatogramm nach Entwickeln mit Fl.1 (linke Seite) und Fl.3 (rechte Seite) und Detektion nach Bratton-Marshall (rechte Seite)
 N 34 bis 48 : Harnextrakte nach vorangegangener quantitativer Extraktion und anschließender Inkubation mit Ketodase
 Z_V (links) wurde abgeschabt und erneut chromatographiert (rechts)

der Konjugate schien ebenfalls erst nach längerer Zeit ein Maximum zu erreichen.

Auch hier sollten die Untersuchungen an sofort extrahiertem, nicht gelagertem Harn vorgenommen werden. Je 100 ml der extrahierten Harne Th.1 und 2 wurden inkubiert und nach erneuter Extraktion mit Fl.1 chromatographiert (Abb.28). Es waren bis zu 7 Bratton-Marshall-mit -Reduktion-positive Substanzflecken erkennbar, besonders auffällig in Höhe der R_f -Werte von II und VI.

Zur quantitativen Erfassung der konjugiert vorliegenden, durch Inkubation mit Ketodase bei pH 4,6 gespaltenen 7-Amino-Metaboliten wurde wieder die Bratton-Marshall-Methode nach C III,3 angewendet. Es fand sich aus 30 ml Th.2 eine Extinktion von $E_{551\text{ nm}} = 0,205$ ($=0,58\gamma/\text{ml}$ Harn, $= 1,03$ mg bezogen auf II/24 Stunden),

das heisst, es waren nach dieser Methode noch einmal etwa 2,5% der eingenommenen Menge Nitrazepam (I) nach Spaltung von polaren Bindungen erfassbar, halb so viel wie der nicht gebundene Anteil (vergl. C IV, 2f). Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden die Bedingungen der Inkubation systematisch untersucht.

1) Vollständigkeit der Vorextraktion : Der dreimal mit Äthylacetat extrahierte Harn wurde nochmals extrahiert und der Extrakt rückstand chromatographiert. Wie die Abb. 33 zeigt, (extrah., ganz rechts im Bild), war die Vorextraktion so gut wie quantitativ verlaufen.

2) Störende Substanzflecken durch Ketodase : Die Zugabe von Ketodase zum extrahierten Harn ergab bei erneuter Extraktion keine störenden Substanzflecke (Abb. 33, Th. 2_{F alt} ohne Inkub.)

3) Aktivität der Ketodase : Um zu prüfen, ob die vorhandene Ketodase, die bereits über ein Jahr im Kühlschrank bei 4°C gelagert worden war und bei dieser Temperatur unbegrenzt haltbar sein sollte, noch aktiv war, wurde mit neubeschaffter Ketodase^x die Aktivität dünn-schichtchromatographisch verglichen (Abb. 33, Th. 2_{F neu} und Th. 2_{F alt}). Es ergab sich kein Unterschied.

4) Inkubation ohne Ketodase : Wurden die Harnproben ohne Ketodase bei pH 4,6 inkubiert (Abb. 33, Th. 2_{pH}), erhielt man ein ähnliches Bild wie bei Inkubation mit Ketodase, so dass die Aktivität des Fermentes nicht beurteilt werden konnte. Es liess sich daher weiterhin über die Art der Bindung nur aussagen, dass die vorhandenen Konjugate sehr säureinstabil waren.

^xWir danken der Firma Gödecke für die Überlassung einer Probeflasche Ketodase.

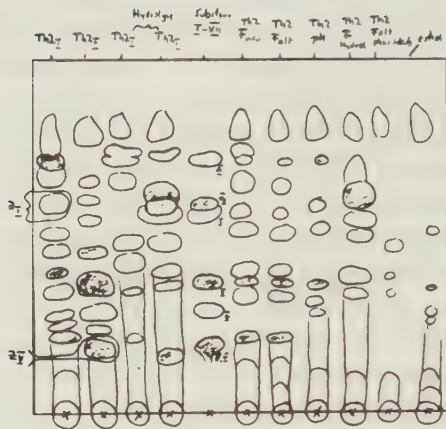


Abb. 33 : Minnschichtchromatogramm nach Entwickeln mit Fl.1 und Detektion nach Bratton-Marshall (positiv : schwarz)

Th.2_I und II : Harnextrakte (s. C IV,5b, S.75)

Th.2_I und II Hydrolyse : Harnextrakte nach salzsaurer Hydrolyse

Th.2_F neu und alt : Harnextrakte nach Inkubation mit frischer und alter Ketodase

Th.2_H : Harnextrakte nach Inkubation bei pH 4,6 ohne Ketodase

Th.2_F Hydrolyse : Harnextrakte nach erfolgter Inkubation und Extraktion und anschliessender Hydrolyse

Th.2_F alt ohne Inkub. : Harnextrakte nach Zusatz von Ketodase ohne Inkubation

extrah. : Harnextrakt bei Extraktion nach vorangegangener dreimaliger Extraktion

Ob das in Abb. 33 sichtbare VI nur durch Spaltung von Konjugaten oder auch durch Hydrolyse des 7-Ringes der Benzodiazepine entstanden war, liess sich ebenfalls nicht entscheiden.

c. Salzsaure Hydrolyse

Um eventuell noch weitere Konjugate nach fermentativer

Aufarbeitung zu ermitteln, wurden 100 ml des nach Inkubation extrahierten Harnes mit 50 ml 25%-HCl 20 min. am Rückflusskühler gekocht und dann bei pH 8-10 mit Äthylacetat extrahiert (Abb.33, Th.2_IHydrol.) Neben der Spaltung von Konjugaten ist hierbei ausserdem mit einer vollständigen Aufspaltung des 7-Ringes der Benzodiazepine zu 2-Amino-benzophenonen zu rechnen.

Es liess sich noch ein weiterer nicht identifizierter Substanzfleck einer Bratton-Marshall-positiven Verbindung erkennen.

Ebenso wurde nicht vorbehandelter Harn hydrolysiert, extrahiert und der Extrakt mit 0,1n-HCl in Phasen mit schwachen Basen (Th.2_I) und stärkeren Basen (Th.2_{II}) getrennt (Abb.33). Erwartungsgemäss fand sich in der Phase Th.2_{II} durch Aufspaltung des 7-Ringes VII, das schon im Tageslicht auf der Platte ohne Detektion an seiner gelborangen Farbe erkannt werden konnte. In der Phase Th.2_I erschien ausser dem Benzophenon VI ein im kurzwelligen UV-Licht bei 254 nm weissblau fluoreszierender Substanzfleck, der offensichtlich mit Substanz B (s.C IV,2b) identisch war und demnach bei längerer Lagerung des Harns durch Hydrolyse entstand. Darüber hinaus wurden noch 6 weitere z.T. sehr grosse Bratton-Marshall-positive Flecken von Substanzen unbekannter Struktur gefunden.

Die beschriebene salzsaure Hydrolyse bietet also auch eine toxikologische Möglichkeit zum Nachweis von Nitrazepam-Intoxikationen im Harn, zumal die Vergleichssubstanzen VI und VII leicht aus Nitrazepam synthetisiert werden können.

5. Zusammenfassung der Untersuchungen über den Nitrazepam-Metabolismus

Zur Untersuchung der Harnproben wurde folgendes Extraktionsschema ausgearbeitet : Die Extraktion erfolgte bei pH 8-10 mit Äthylacetat, das mit 0,1n-HCl reextrahiert wurde, um die stärkeren Basen, deren Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert worden war, von den schwachen Basen mit intakter Nitrogruppe zu trennen, die in der Äthylacetatphase verblieben. Die schwachen Basen liessen sich nochmals analog durch Ausschütteln mit 10%-HCl in schwächere Basen wie Nitrazepam(I) und 3-Hydroxy-nitrazepam (IV) und in extrem schwache Basen wie 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI) auftrennen.

Die Extraktionsrückstände wurden in verschiedenen Fliessmittelsystemen dünnschichtchromatographiert und zur Detektion nach Bratton-Marshall diazotiert und gekuppelt. Mit dieser Methode liessen sich die Vergleichssubstanzen mit primärer Aminogruppe (II, V, VI und VII) anfärben und alle weiteren Vergleichssubstanzen, wenn zusätzlich mit Natriumdithionit zur Reduktion der Nitrogruppe von I und IV zum primären Amin besprüht oder das 7-Acetamido-derivat (III) mit $2n\text{-H}_2\text{SO}_4$ bei 130° hydrolysiert wurde (vergl.42)

Es liess sich im Harn eine grosse Zahl von Abbauprodukten feststellen, als Hauptmetaboliten jedoch in Übereinstimmung mit Rieder (42) der 7-Amino-metabolit II, von dem bei täglicher Gabe von 40 mg Nitrazepam (I) 4 Tage lang 2 mg oder etwa 5% pro Tag im Harn ausgeschieden wurden, und der 7-Acetamido-metabolit III.

Unverändertes Nitrazepam (I) und das Hydrolyseprodukt 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI) konnten in kleinen Mengen nach starker Anreicherung aus Harn nachgewiesen werden. Erst nach sehr starker Konzen-

trierung aus 3,5 l Harn gelang es auch, den 7-Amino-3-hydroxy-metaboliten (V) nachzuweisen.

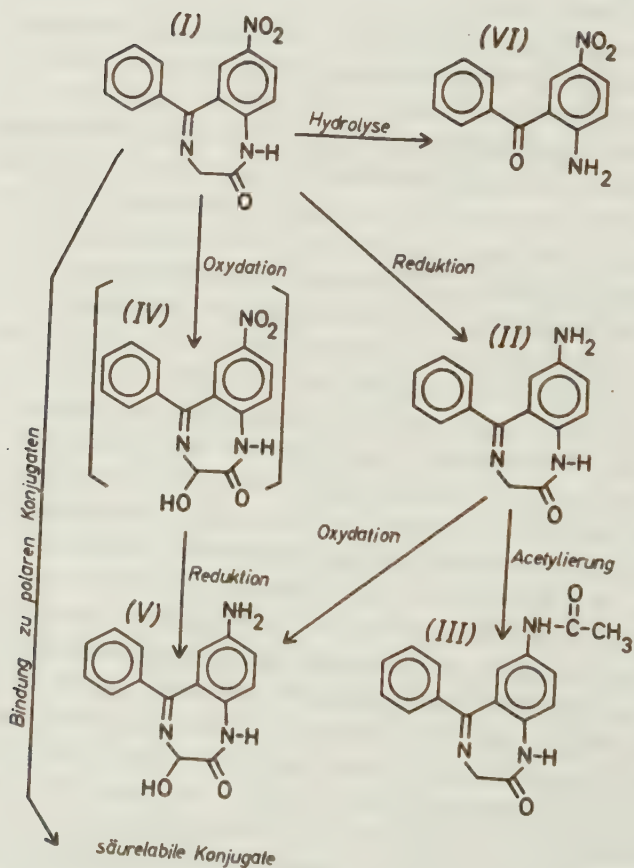
Da der mögliche Präcursor des 7-Amino-3-hydroxy-metaboliten V, das 3-Hydroxy-nitrazepam (IV), noch nicht aufgefunden worden ist, war es nicht möglich zu entscheiden, ob die Oxydation an unverändertem Nitrazepam (I), am 7-Amino-metaboliten II oder an beiden Substanzen stattfand.

Die Identität der Metaboliten mit den Vergleichssubstanzen wurde an Hand folgender Kriterien bewiesen :

- 1) spezifisches Extraktionsverhalten
- 2) übereinstimmende Rf-Werte in 4 Fliessmittelsystemen
- 3) Farbe der Substanzflecken auf der bei 254 nm fluoreszierenden Dünnschichtplatte bei 254 und 356 nm
- 4) charakteristische Färbungen durch Detektion nach Bratton-Marshall-Reaktionen in drei Varianten
- 5) UV-Spektren, deren Maxima stark von der Lage des Substituenten in 7-Stellung der Benzodiazepine bzw. 5-Stellung der Benzophenone abhing

Ein Teil der Metaboliten war zu polaren Konjugaten gebunden, die sich bei Erwärmen der Harnproben bei 48° und pH 4,6 20 Stunden lang soalten liessen. Nach dieser Hydrolyse konnten aus quantitativ extrahiertem Harn nochmals eine Reihe von Substanzen extrahiert werden, darunter der 7-Amino-metabolit II und 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI). Über die Art der polaren Bindung liessen sich keine genauen Aussagen machen. Nach salzsaurer Hydrolyse durch Erhitzen am Rückflusskühler konnten mit Äthylacetat bei pH 8-10 neben anderen Bratton-Marshall-positiven Zersetzungsprodukten 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI) in der Phase der schwachen Basen und 2,5-Diamino-benzophenon (VII) in der Phase der stärkeren Basen als Zersetzungsprodukte extrahiert werden. Daraus ergab sich eine weitere Möglichkeit zum toxikologischen Nachweis von Nitrazepam (I) aus Harn, zumal die Benzophenone leicht synthetisiert werden konnten.

An dem Beispiel des Nitrazepams liessen sich also alle grundlegenden Schritte des Metabolisierungsprozesses nachweisen : Reduktion, Oxydation, Hydrolyse und Bindung zu polaren Konjugaten.



D PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG

D I Analytische Daten in Monographien

1. Chlordiazepoxid

Summenformel : $C_{16}H_{14}ClN_3O$

Mol.-Gew. : 299,8 (Base), 336,2 (Hydrochlorid)

Synthese : Sternbach u. Reeder (4)

Beschreibung : Base : farbloses, kristallines

Pulver vom Schmelzpunkt 236-236,5°

Hydrochlorid : Schmelzpunkt 215-6°, mit stark bitterem Geschmack

Löslichkeit : Base : in organischen Lösungsmitteln und in verdünnten Mineralsäuren löslich, nicht löslich in Petroläther

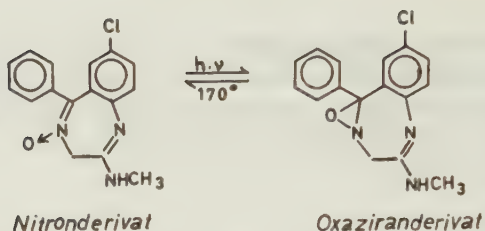
Hydrochlorid : in Chloroform, Äther und Isopropanol schwer löslich, in Wasser löslich (1 g/100 ml)

UV-Absorption : Base :

Lsgsmttl.	Max. (nm)
Äther	243, 265
Äthanol	245, 262, 308
Hydrochlorid : Methanol	245, 263 ($E_{1cm}^{1\%}=928$), 308
O,1n-HCl	245, ($E_{1cm}^{1\%}=980$), 306

Das Hydrochlorid besitzt in 80%-igem Äthanol auf Grund vollständiger Hydrolyse (45) dasselbe Spektrum wie die Base (Maximum bei 265 nm). Das Spektrum in nichtgereinigtem Chloroform ändert sich beim Verdünnen, so dass neue Maxima auftreten können. Unter Lichteinwirkung ändert sich das Spektrum rasch durch Bildung eines Oxaziridin-Ringes. Durch Erhitzen auf 170° ist die Reaktion rückläufig (88, 118).

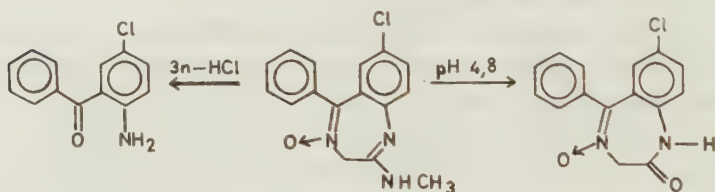
Die Umwandlung erfolgt sehr leicht, da die beiden Arylreste am C-Atom des Oxaziridinringes eine sich ausbildende positive Ladung in Benzylstellung stabilisieren (88).



UV-Spektrum in Isopropanol : Maxima bei
 245, 265 $\xrightleftharpoons[170^\circ]{h \cdot \nu}$ 278 nm

Das Oxaziridin-Lerivat oxydiert Jodid zu Jod
 im Gegensatz zum entsprechenden Nitron, in dem
 der Sauerstoff inaktiv ist (119).

Verhalten gegen Säuren : Bei milder saurer Hydrolyse



(Glycin-HCl-Puffer pH 4,8) entsteht das "Laktam"
 (5), bei Hydrolyse mit 3n-HCl das 2-Amino-5-chlor-
 benzophenon (4). (Schmelzpunkt 96-97°, UV-Spek-
 trum in Chloroform : Maxima bei 242 und 381 nm)

IR-Spektrum in KBr : starke Banden bei 1680, 1150,
 770, 690 cm^{-1}

2. Diazepam

Summenformel : $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$

Mol.-Gew. : 284,8

Synthese : Sternbach und Mitarb. (125)

Beschreibung : schwach gelbliche, kristalline Substanz
 vom Schmelzpunkt 125-26° mit leicht bitterem Ge-
 schmack

Löslichkeit : löslich in Chloroform, Äthanol und Dioxan,

in verdünnter HCl gelb löslich

nicht löslich in Petroläther

UV-Absorption :

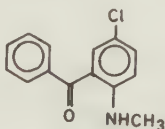
Lsgsmttl.	Max. (nm)
Äthanol	230 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}=1140$)
Chloroform	243,5 , 285 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}=298$), 366
0,02n-HCl	240 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}=975$) 284 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}=464$) 358 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}=143$)

Verhalten gegen Säuren : Bei Hydrolyse mit 3n-HCl

entsteht 5-Chlor-2-methylamino-benzophenon (30)

(Schmelzpunkt $95-6^{\circ}$, UV-Spektrum in Chloroform :

Maxima bei 251 und 410 nm)



IR-Spektrum in KBr : starke Banden bei 1695, 1490,
1130, 745, 710 cm^{-1}

3. Nitrazepam

Summenformel : $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$

Mol.-Gew. : 281,3

Synthese : Sternbach und Mitarb. (81)

Beschreibung : gelbliche, kristalline Substanz vom

Schmelzpunkt 224-260 mit leicht bitterem Geschmack

(125) L.H.Sternbach, R.J.Fryer, W.Metlesics, E.Reeder,
G.Sach, G.Saucy u.A.Stempel, J.Organ.Chem.

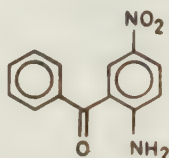
27, 3788(1962)

Löslichkeit : löslich in Aceton, Äthanol und Essigsäureäthylester, wenig löslich in Äther und Benzol, nicht löslich in Wasser

UV-Absorption :	Lsgsmttl.	Max. (nm)
	Methanol	258 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}=595$), 310
	Chloroform	265 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}=627$)
	0,1n-NaOH	230, 366
	0,2n-HCl	330 (Schulter), 278

Durch Salzbildung kommt es in verdünnter NaOH zu einer starken bathochromen Verschiebung.

Verhalten gegen Säuren : Bei Hydrolyse mit 3n-HCl entsteht 2-Amino-5-nitro-benzophenon (126) (Schmelzpunkt: 162-63°, Schmelzpunkt des Hydrates: 144-45°, UV-Spektrum in Chloroform : Maximum bei 350 nm, in Methanol Maxima bei 355 und 236 nm).



IR-Spektrum in KBr : starke Banden bei 1700, 1615, 1340, 740, 700 cm^{-1}

4. Oxazepam

Summenformel : $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$

Mol.-Gew. : 286,7

Synthese : Bell und Childress (112)

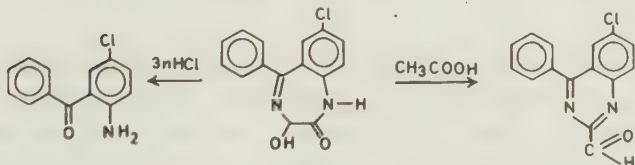
Beschreibung : farblose, kristalline Substanz vom Schmelzpunkt 203-4° mit leicht bitterem Geschmack.

Löslichkeit : löslich in Dimethylformamid, etwas löslich in Äthanol und Chloroform, wenig löslich in 3n-HCl, nicht löslich in Wasser.

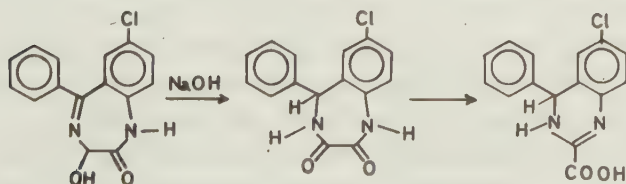
UV-Absorption :

Lsgsmttl.	Max. (nm)
Chloroform	243, 280 (Schulter), 309
Äthanol	229 ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1420$) 250 (Schulter), 308
0,5n-NaOH	234, 340
0,02n-HCl	232, 278

Verhalten gegen Säuren : Bei Hydrolyse mit 3n-HCl entsteht 2-Amino-5-chlor-benzophenon, das mit dem Hydrolyseprodukt des Chlordiazepoxids identisch ist (31). In heisser Essigsäure entsteht ein Chinazolin-carboxaldehyd über eine ringoffene Zwischenstufe (127).



Verhalten gegen Basen : Unter dem Einfluss von NaOH



bei Erwärmen auf dem Wasserbad isomerisiert Oxazepam, wobei die C=N-Bande im UV bei 310 nm verloren geht und eine neue Bande bei 291 nm entsteht (57). Bei längerem Erwärmen isomerisiert die entstandene Verbindung weiter zu einer Chinazolin-carbonsäure.

IR-Spektrum in KBr : starke Banden bei 1720, 1700, 1610, 1130, 745, 700 cm^{-1}

D II Messtechnische Daten

=====

1) Absorptionsspektren im UV- und sichtbaren Bereich wurden mit einem selbstregistrierenden Spektrophotometer (Zeiss RPQ 20 A) in 0,5 cm Quarzküvetten (=1 cm optische Weglänge) ausgemessen.

2) IR-Spektren wurden mit je 1 mg Substanz in KBr in einem Perkin-Elmer Spektrophotometer Modell 237 aufgenommen.

3) Schmelzpunkte wurden mit einem Heiztischmikroskop nach Kofler bestimmt und waren korrigiert. Die Substanzen mit einem Schmelzpunkt von über 130° wurden vorher bei 110° etwa 12 Stunden im Vakuum über P_2O_5 getrocknet, mit einem Schmelzpunkt von unter 130° bei entsprechend niedrigerer Temperatur.

4) C- und H-Analysen wurden vom Laboratorium Ilse Beetz (8640-Kronach, Industriestr.7), N- und Cl-Bestimmungen sowie Molekulargewichtsbestimmungen mit einem Dampfdruckosmometer im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

5) Als Messinstrumente bei der potentiometrischen Titration im wasserfreien Medium dienten eine Einstab-Messkette, Type 405 (Ingold), und ein Labor-pH-Meter, Type 260 (Knick), das mit Bicoufferlösungen von pH 7 und pH 4 geeicht wurde. Einstellung des pH-Meters : Steilheit 58 mV/pH, Temperatur 20°,

Messbereich -100 bis +700 mV. Die Titrationen wurden mit einer automatischen, mit Calciumchloridrohren gegen Feuchtigkeit geschützten Bürette durchgeführt (Bürettenvolumen 10 ml, Skaleneinteilung 0,02 ml).

D III Titration in nichtwässrigem Medium (zu B II)
=====

1) Potentiometrische Endpunktbestimmung

a) 0,05n-HClO₄ in Eisessig : Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an Monographieentwürfe für ein DAB 7.

Zu 4,25 ml 70%-HClO₄ (=7,25 g) wurden 500 ml Eisessig und 15 ml Essigsäureanhydrid zugesetzt. Nach Abkühlen wurde mit Eisessig auf 1000 ml aufgefüllt. Nach 24 Stunden konnte der Faktor eingestellt werden. Da nach (128) ein Wassergehalt bis zu 1,5% im Allgemeinen nicht stört, wurde auf eine Wasserbestimmung nach Karl Fischer verzichtet.

b) 0,01n-HClO₄ in Eisessig : 200,0 ml 0,05n-HClO₄ wurden mit Eisessig auf 1000 ml aufgefüllt.

c) Äquivalenzpunktbestimmung : Es wurden mV gegen ml aufgetragen. Der Wendepunkt wurde durch die mittlere Parallele zweier paralleler Tangenten graphisch festgelegt.

d) Einstellen der Normallösungen : Kaliumhydrogenphthalat als Urtiler ergab einen schärferen Potential-sprung als Natriumkarbonat.

0,05n-HClO₄ : 60-70 mg pulverisiertes, bei 105° 2 Stunden lang getrocknetes Kaliumhydrogenphthalat, genau gewogen (=E), wurden in 40 ml Eisessig gelöst und unter magnetischem Rühren potentiometrisch titriert.

(128) P.C.Markunas u. J.A.Riddick, Analyt.Chem. 23, 337
(1951)

(129) DIN 1319, Januar 1962

Faktor $F = \frac{E}{10,2114 \cdot a}$ (a = ml 0,05n-HClO₄-Verbrauch)

e) Reagenzien : Eisessig p.a. (99-100%),

Hg-II-acetatLösung : 3 g Hg-II acetat wurden in 100 ml Eisessig gelöst.

f) Darstellung der Ergebnisse : Lagen 5 Messergebnisse und mehr vor, wurde das Ergebnis E nach I-IN dargestellt (129). Es wurden die relative Standardabweichung s und der erhaltene Mittelwert x in % mit Vertrauensbereich für die statistische Sicherheit P = 95% angegeben.

Ergebnis $E = x \pm \frac{t}{\sqrt{n}} \cdot s$

E= Ergebnis

x= Mittelwert in %

t= Faktor, abhängig von der statistischen Sicherheit und Zahl der Messungen

n= Zahl der Messungen

s= relative Standardabweichung

g) Titrationen : 50-60 mg (bzw. 10-20 mg) Reinsubstanz wurden in 40 ml Eisessig gelöst und mit 0,05n-HClO₄ (bzw. 0,01n-HClO₄) potentiometrisch titriert. Bei Chlordiazepoxid-Hydrochlorid wurde auf dem Wasserbad erwärmt, bis die Substanz gelöst war, und nach dem Abkühlen 1,5 ml Hg-II-acetatLösung für je 60 mg Substanz zugesetzt.

	Chlordiazepoxid	Chlordiazepoxid·HCl	Diazepam	Nitrazepam	Oxazepam
1 ml 0,05n-HClO ₄ entspricht mg	1,99	16,81	11,2	11,07	11,31
1 ml 0,01n-HClO ₄ entspricht mg	2,998	3,362	2,848	2,813	

2) Visuelle Endpunktbestimmung

a) Einstellen des Faktors : 60-70 mg Kaliumhydrogenphthalat (s.o.) wurden in 30 ml Eisessig gelöst, mit 3 Tropfen KristallviolettLösung versetzt und bis zum

Farbumschlag nach Blau titriert.

b) Kristallviolettlösung : 100 mg Kristallviolett (N,N,N',N',N'',N'' -Hexamethyl-pararosanilinchlorid) wurden in 100 ml Eisessig gelöst.

c) Titrationen : 50-60 mg Reinsubstanz wurden in 30 ml Eisessig (bzw. Essigsäureanhydrid) gelöst und nach Zusatz von 3 Tropfen Kristallviolettlösung mit 0,05N-HClO₄ nach Grünblau (bzw. Gelb) titriert. Oxazepam löste sich in Essigsäureanhydrid nur in der Wärme. Zur Bestimmung des Blindwertes in Essigsäureanhydrid wurde zu 30 ml ein der Titrationsmenge entsprechendes Volumen Eisessig und 3 Tropfen Kristallviolettlösung zugesetzt und nach Gelb titriert.

D IV Farbreaktion nach Bratton-Marshall (zu B III) =====

1) Reagentien :

- a) 0,4%-NaNO₂-Lsg.: 0,1 g NaNO₂ wurden in 100 ml Wasser gelöst.
- b) 2%-Sulfaminsäure-Lsg.: 2 g Sulfaminsäure wurden in 100 ml Wasser gelöst.
- c) 0,4%-Kupplungsreagenz : 0,4 g N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid wurden in 100 ml Wasser gelöst.

Die Lösungen a) und c) waren frisch herzustellen.

2) Messbereich

Zwischen E = 0,1 bis 1,0 war das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt.

3) Eichkurven

Nach folgender Vorschrift wurden Eichkurven für Nitrazepam, Chlordiazepoxid-Hydrochlorid und Oxazepam aufgestellt:

5-50 γ Substanz wurden in 10%-HCl 15 min. am Rückflusskühler gekocht, mit 2 ml Wasser in einen 10 ml Messkolben übergespült, mit 0,2 ml 0,4 %-NaNO₂-Lsg. unter

Eiskühlung, nach 3 min. mit 0,2 ml 2%-Sulfaminsäure-Lsg. bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Schütteln und nach weiteren 10 min. mit 0,2 ml 0,4%-Kupplungsreagenz versetzt. Mit Wasser wurde bis zur Marke aufgefüllt und nach 30-40 min. bei 533-35 nm (Nitrazepam) bzw. bei 543-45 nm (Chlordiazepoxid und Oxazepam) in Küvetten mit 1 cm optischer Weglänge ausgemessen.

Mit vorangehender Extraktion :

5-50 µg Substanz in 10 ml Wasser (bzw. Leerharn) wurden mit Natriumkarbonat-Lösung auf pH 8-10 eingestellt und mit 2 mal 5 ml Äthylacetat je 5 min. mechanisch geschüttelt (und eventuell 5 min. bei 4000 U/min. zentrifugiert). Die organischen Phasen wurden gesammelt und mit 5 ml 10%-HCl durch 10 min. langes mechanisches Schütteln reextrahiert. Die salzsaure Phase wurde unter Nachspülen mit 2 ml Wasser in einen 50 ml Schliffkolben abgetrennt und weiter wie oben hydrolysiert, diazotiert und gekuppelt. Die Blindproben werden analog behandelt.

D V Kernmagnetische Protonenresonanz =====

1) a. Gerät : Varian-N.M.R.-Spektrometer A-60A

b. Aufnahmebedingungen : Lösungsmittel : deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆), Filter-Bandbreite: 4Hz

R.F.-Feld : 0,025 - 0,04 mG

Reg.-Zeit : 500 sec.

Reg.-Bereich: 500 oder 1000 HZ

Spektrum-Ampl. : 32 - 63

Integral-Ampl. : 50 - 80

Innerer Standard : TMS (= 0 ppm)

2) Synthese und Reinigung der Substanzen

- a. Chlordiazepoxid-Base aus dem Hydrochlorid
Eine wässrige Lösung des Hydrochlorids wurde mit Natriumcarbonat versetzt und die ausgefallene Base abfiltriert, mehrmals aus Äthanol/Wasser und Methylenchlorid/Äther/Petroläther umkristallisiert. Mehrfaches Umkristallisieren war notwendig zur Beseitigung paramagnetischer Verunreinigungen.
- b. Diazepam wurde mehrmals aus Äthanol/Wasser, Nitrazepam aus Äthanol und Oxazepam aus Äthanol/Dimethylformamid umkristallisiert.
- c. 2-Amino-5-chlor-benzophenon aus Oxazepam
1 g Oxazepam wurde in 20 ml konz. HCl 20 min. am Rückflusskühler erhitzt, mit 3n-NaOH bis zur alkalischen Reaktion versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Phase wurde mit 3n-HCl gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum abgedampft und der Rückstand mehrmals aus Äthanol/Wasser umkristallisiert.
- d. 5-Chlor-2-methylamino-benzophenon aus Diazepam
0,2 g Diazepam wurden in 8 ml Methanol gelöst, mit 10 ml konz. HCl versetzt und 15 min. am Rückflusskühler erhitzt. Die heisse Lösung wurde mit 40 ml Wasser versetzt und der Niederschlag nach Kühlen im Eisschrank abfiltriert und noch zweimal aus Äthanol/Wasser umkristallisiert.
- e. Synthese von 2-Amino-5-nitro-benzophenon und 2,5-Diamino-benzophenon s.u. Die erhaltenen Substanzen wurden noch zweimal aus Benzol umkristallisiert, das beim Trocknen nicht vollständig entfernt wurde und daher im N.M.R.-Spektrum als Singulett mit einer chemischen Verschiebung von $\delta=7,35$ ppm erschien.

- f. 1,3-Dihydro-1-methyl-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (81)
2,8 g Nitrazepam (0,1 Mol) und ein Überschuss an Natriummethylat (0,12 Mol) wurden in 20 ml N,N-Dimethylformamid 30 min. bei Raumtemperatur gerührt und bei 5°C mit 16 g Methyljodid langsam versetzt. Nach 1 Stunde Rühren bei 5°C wurde die Lösung in 200 ml Wasser gegossen und mit Methylenchlorid extrahiert. Die Methylenchloridphase wurde dreimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum abgedampft. Das zurückbleibende Öl wurde dreimal aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 1,1 g vom Fp 156-57°.
- g. 7-Chlor-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on-4-oxid ("Laktam") aus Chlordiazepoxid·HCl (vergl. 5,87) 500 mg Chlordiazepoxid·HCl wurden in 50 ml Wasser gelöst und mit 5 ml pH 4,6-Puffer (5 ml 1n-NaOH und 10 ml 1n-CH₃COOH mit Wasser auf 50 ml auffüllen) versetzt und 4 Stunden unter Lichtabschluss am Rückflusskühler erhitzt. Es wurde zweimal mit Methylenchlorid extrahiert, zweimal mit 1n-NaOH reextrahiert und nach Neutralisieren der wässrigen Phase erneut mit Methylenchlorid zweimal extrahiert. Diese Methylenchloridphasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum abgedampft und der Rückstand aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 170 mg (=40% d.Theor.) weisse Kristalle vom Fp 236-7°.
- h. 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on- -oxid (methyliertes "Laktam") aus Diazepam (vergl.130,131)

(130) L.H.Sternbach u.E.Reeder, J.Organ.Chem.26,4936(61)
(131) S.C.Bell u.S.J.Childress, J.Organ.Chem.27,562
(1962)

2,8 g Diazepam wurden in 20 ml Eisessig und 1,2 ml 30%-H₂O₂ gelöst und auf 80°C erwärmt. Nach jeweils 2 Stunden wurden noch 3 x 0,6 ml 30%-H₂O₂ zugesetzt und die Lösung insgesamt 10 Stunden bei 80°C gehalten. Nach 36 Stunden bei Raumtemperatur wurde mit Eiswasser verdünnt, mit Kaliumkarbonat neutralisiert und zweimal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Methylenchloridphasen wurden zweimal mit 3n-HCl gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum abgedampft. Der ölige Rückstand wurde aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 2,2 g (=75% d.Theor.) vom Fp. 179-80°.

D VI Synthese möglicher Nitrazepam-Metaboliten
=====

(zu C II)

1) Phenyllessigsäurechlorid (132)

50 g Phenyllessigsäure wurden in 80 ml trockenem Chloroform gelöst und mit einer äquimolaren Menge PCl₅ (76 g) versetzt. Es wurde auf dem Wasserbad erwärmt, bis kein HCl mehr entwich, und bei stark vermindertem Druck zuerst Chloroform und POCl₃, dann bei 95° und 12 mm Hg Phenyllessigsäurechlorid als farblose Flüssigkeit abdestilliert. Ausbeute 40 g (71% der Theorie)

2) Desoxybenzoin (Phenylbenzylketon) (133)

In eine Lösung von 50 g Phenyllessigsäurechlorid in Benzol im Überschuss wurde solange trockenes AlCl₃ eingetragen, wie sich noch eine Reaktion zeigte. Darauf wurde mit Wasser versetzt, mit ver-

(132) R. Anschütz u. W. Berns, Chem. Ber. 20, 1389 (1887)
(133) C. Traebe u. A. Bungener, Chem. Ber. 12, 1080 (1879)

dünnter KOH gewaschen und das Un~~e~~gelöste bei 177° und 12 mm Hg destilliert. Ausbeute 40 g (76% der Theorie) farblose Substanz vom Fp 57-8°.

3) Desoxybenzoin-p-nitro-phenylhydrazon (134)

25 g p-Nitro-phenylhydrazin wurden mit 35 g Desoxybenzoin 30 min. auf 135° erhitzt und nach dem Erkalten aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 52 g (83% der Theorie) orangeroter Kristalle vom Fp 159-60°.

4) 2,3 Diphenyl-5-nitro-indol (110)

52 g Desoxybenzoin-p-nitrophenylhydrazon wurden in 500 ml Eisessig und 500 ml konz.HCl 10 Stunden unter Rückflusskühlung gekocht, mit Wasser verdünnt, abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 42 g (85% der Theorie) goldgelbe Kristalle vom Fp 198-200°.

5) 2-Benzoylamido-5-nitro-benzophenon (110)

42 g 2,3-Diphenyl-5-nitro-indol wurden in 1,2 l Eisessig gelöst und 19 g CrO₃ in 30 ml Wasser unter Rühren zuge~~e~~tropft. Nach 12 Stunden wurden 1,2 l Wasser zuge~~e~~geben, abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 24 g (57% der Theorie) blassgelber Kristalle vom Fp 196-8°.

6) 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI) aus 2-Benzoylamido-5-nitro-benzophenon (110)

7,5 g 2-Benzoylamido-5-nitro-benzophenon wurden in 300 ml Eisessig und 300 ml konz.HCl 4 Stunden am Rückflusskühler gekocht, mit NH₃-Lösung neutralisiert, abgesaugt und aus Benzol umkristallisiert. Ausbeute 5 g (96% der Theorie) gelbe Kristalle vom Fp 162-3°.

7) 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI) aus I

500 mg I wurden in 10 ml Methanol und 5 ml 25%-HCl gelöst, 1 Stunde im Wasserbad unter Rückflusskühlung erwärmt, mit 20 ml Wasser versetzt und nach 1 Stunde abgesaugt. Ausbeute 370 mg VI (86% der Theorie).

8) 2,5-Diamino-benzophenon (VII) aus I

500 mg I wurden mit 2 g Zinn-Pulver in 15 ml 10%-HCl unter Rühren erwärmt, bis die Lösung fast farblos wurde (nach fast 30 min.), und mit 3n-NaOH alkalisiert. Nach Extraktion mit Methylenchlorid wurde in 3n-HCl reextrahiert und erneut nach Alkalisieren mit Methylenchlorid extrahiert. Die Methylenchloridphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Ausbeute 264 mg VII (70% der Theorie) orangefarbene Kristalle vom Fp 149-151,5° (aus Benzol umkristallisiert).

ber.: C:73,59%, H:5,70%, N:13,20%, Mol.-Gew.:212,2

gef.: C:73,22%, H:5,71%, N:12,59%, Mol.-Gew.:231,5

9) 2,5-Diamino-benzophenon (VII) aus VI mit Sn/HCl

500 mg VI wurden mit 1,5 g Zinn-Pulver in 10 ml 10%-HCl 1 Stunde unter Rühren am Rückflusskühler erhitzt, mit 10 ml Wasser verdünnt und die salzsaure Phase mit Methylenchlorid gewaschen. Die wässrige Phase wurde alkalisiert und mit Methylenchlorid extrahiert, das mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft wurde. Ausbeute nach Umkristallisieren aus Benzol 230 mg VII (52% der Theorie).

10) 2,5-Diamino-benzophenon (VII) aus VI mit Hydrazin/Raney-Nickel

500 mg VI wurden in 10 ml Äthanol gelöst, mit 0,3 g Hydrazin-Hydrat (80-100%) versetzt und auf 30-40° erwärmt. Zu der Lösung wurde anteilweise eine alkoholische Suspension von hochaktivem Raney-Nickel (99) gegeben, bis keine N₂-Entwicklung mehr stattfand.

Nach einer Stunde Erhitzen am Rückflusskühler wurde mit Wasser verdünnt und der Niederschlag abgesaugt und aus Benzol umkristallisiert. Ausbeute 125 mg VII (29% der Theorie).

11) 2-Amino-5-nitro-benzophenon-oxim (VIII) (81) 1,4 g VI und 1 g $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ wurden in 10 ml Pyridin und 30 ml Äthanol 20 Stunden am Rückflusskühler gekocht, im Vakuum eingeengt, mit Äther versetzt und mit Wasser gewaschen. Die ätherische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Nach Umkristallisieren aus Äthanol Ausbeute 12 g VIII (61% der Theorie). Gelbe Kristalle vom Fp $206-8^\circ$ (α -Oxim) (nach nochmaligem Umkristallisieren aus Äthanol).

12) 2-Chloromethyl-6-nitro-4-phenyl-chinazolin-3-oxid (IX) (61)

7 g VIII wurden in 50 ml Eisessig und 6 ml Chloracetylchlorid 2 Stunden auf 70° erwärmt und nach 20 Stunden bei Raumtemperatur im Vakuum eingeengt, mit Methylenchlorid aufgenommen und mit Natriumkarbonat-Lösung gewaschen. Die Methylenchlorid-Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Beim Umkristallisieren des zurückbleibenden Öls aus Äther wurde ein gelbliches Substanzgemisch erhalten, aus dem eine gelbe Fraktion erhalten werden konnte. Diese Fraktion wurde nochmals aus Methylenchlorid/Äther umkristallisiert und ergab 600 mg IX vom Fp $207-9^\circ$. Die zweite Fraktion ergab 5,05 g eines weisslichen Substanzgemisches, das zur weiteren Umsetzung nicht aufgetrennt wurde.

13) 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on-4-oxid (X) aus I (vergl. (135))

5,6 g I wurden in 40 ml Eisessig gelöst, mit 2,4 ml

30%-H₂O₂ versetzt und auf 80° erwärmt. Nach je 2 Stunden wurden noch 3 mal 0,6 ml 30%-H₂O₂ zugegeben, 20 Stunden stehen gelassen, danach mit Wasser und Eis versetzt und mit Kaliumkarbonat neutralisiert. Die Lösung wurde mit Methylenchlorid extrahiert, mit 3n-HCl gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum abgedampft. Ausbeute 3,05 g eines stark verunreinigten Produktes, aus dem sich X nur schwer isolieren liess. Wurde das Rohprodukt mit Essigsäureanhydrid zu IV umgesetzt, erhielt man eine Ausbeute von nur etwa 15%.

14) 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on-4-oxid (X) aus IX

4 g des IX enthaltenden gelblichen Gemisches (s.12)) wurden in 80 ml Äthanol und 8 ml 3n-NaOH gelöst und 1 Stunde bei 20° stehen gelassen. Dann wurde 3n-HCl zugegeben, bis der pH 4-5 betrug, mit Äther extrahiert und mit 1n-NaOH reextrahiert. Nach Ansäuern wurde erneut mit Äther extrahiert und die Ätherphase mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum abgedampft. Das Rohprodukt wurde aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 1,1 g (29% der Theorie ber. auf IX) gelbe Kristalle vom Fp 164-5°. Die Schmelze wurde sofort wieder fest und schmolz erneut bei 220-2°.

15) 3-Acetoxy-1,3-dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (XI) (111)

1 g X wurde in 5 ml Essigsäureanhydrid 1 Stunde auf 80° erwärmt und nach Eiskühlung das ausgefallene XI abgesaugt. Ausbeute 900 m. (79% der Theorie) schwach gelbliche Kristalle vom Fp 267-9°.

16) 1,3-Dihydro-3-hydroxy-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (IV) (111)

1,6 g XI, suspendiert in 35 ml Äthanol und 10 ml 1n-NaOH, wurden 10 min. bei Raumtemperatur und

10 min. bei 40° gehalten, mit 10 ml Wasser und nach 15 min. mit 5 ml 1n-HCl versetzt. Nach Eiskühlung wurde abgesaugt und aus Äthanol/wenig Dimethylformamid umkristallisiert. Ausbeute 1,2 g (86% der Theorie) blassgelbe Kristalle vom Fp 218-20°.

17) 7-Amino-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (II) aus I (81)

500 mg I wurden in 30 ml Äthanol warm gelöst, etwas Raney-Nickel-Suspension zugegeben und bei 25° und Atmosphärendruck in der Schüttelente hydriert. Nach Aufnahme von etwa 130 ml H₂ nach 4-5 Stunden wurde der Katalysator abfiltriert, die Lösung im Vakuum eingedampft und aus Methylenchlorid umkristallisiert. Ausbeute 400 mg weissgelbliche Substanz vom Fp um 185°. Nach weiterem Umkristallisieren aus Methylenchlorid/wenig Dimethylformamid Ausbeute 100 mg vom Fp ~200°. Die Mutterlauge wurde mit Ligroin versetzt und dadurch 50 mg weisslicher Kristalle vom Fp 215-30° gefällt, die mit vorhandenem II übereinstimmten, aber noch etwas verunreinigt waren.

18) 7-Amino-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (V) aus IV

500 mg IV wurden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und 25 ml Äthanol und etwas Raney-Nickel-Suspension zugegeben. Es wurde bei 25° und Atmosphärendruck in der Schüttelente bis zur Aufnahme von etwa 124 ml H₂ (3 Mol H₂/1 Mol IV) nach 4-5 Stunden hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung mit Methylenchlorid versetzt, mit 0,1n-HCl ausgeschüttelt und die salzsaure Phase neutralisiert und mit Methylenchlorid reextrahiert. Die Methylenchloridphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft und der Rückstand aus

Methylenchlorid/Dimethylformamid/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 100 mg (22% der Theorie) blass gelblichweisse Kristalle vom Fp $>300^{\circ}$.

ber.: C:67,38%, H:4,90%, N:15,72%, Mol.-Gew.:267,3
gef.: C:66,05%, H:4,80%, N:13,11%, Mol.-Gew.:

konnte im Dampfdruckosmometer nicht bestimmt werden, da die Substanz in Äthanol, Aceton und Dioxan schwer löslich war.

19) Raney-Nickel-Suspension (119)

5 g der 50%-igen Raney-Nickel-Legierung wurden mit 50 ml Wasser und in Anteilen mit etwa 8 g NaOH-Rotuli versetzt, 30 min. im Wasserbad auf 70° erwärmt, 4 mal mit je 50 ml Wasser, 2 mal mit je 50 ml 0,1%-Essigsäure und 3 mal mit je 50 ml Äthanol gewaschen. Der Katalysator wurde unter Äthanol aufbewahrt und nach etwa 20 Stunden zum Hydrieren verwendet.

D VII Bratton-Marshall-Reaktion einiger Modellsubstanzen (zu C III,3)

1) Schema: Hydrolyse von I und II zu VI und VII und Trennung der entstandenen Benzophenone

Lösung a : 400 γ II in 5 ml 10%-HCl	Lösung b : 400 γ I und 400 γ II in 5 ml 10%-HCl
20 min. am Rückflusskühler erhitzen, alkalisieren, extrahieren in 10 ml Äther, UV-Absorption messen	
$E_{425nm}=0,558$ ($E_{1m}^{1\%}=186$) Konzentration $c=30\gamma/ml$ VII $=88,8\%$ d.Theor.bei 100%-Hydrolyse	
reextrahieren in 5 ml 10%-HCl, extrahierte Ätherphase im UV ausmessen	
$E_{425nm}=0,005$	$E_{350nm}>2,0$ (Absorption von VI)
HCl-Phasen alkalisieren, mit 10 ml Äther reextrahieren und Ätherphasen im UV erneut ausmessen	
$E_{425nm}=0,525$, Extinktionsabfall gegenüber 0,558 6%	$E_{425nm}=0,528$ (Absorption von VII)

2) Arbeitsvorschrift für Eichkurven :

6-30 γ II in 5 ml 0,1n-HCl wurden wie bei B IV diazotiert und gekuppelt und auf 10,0 ml aufgefüllt.

Mit vorangehender Extraktion aus Wasser bzw. Harn :

6-30 γ II in 30 ml Wasser bzw. Harn wurden mit Natriumkarbonat-Lösung auf pH 8-10 eingestellt, eventuell zentrifugiert nach jeweils 10 min. mechanischem Schütteln mit 10 ml Äthylacetat und 5 min. mit 5 ml Äthylacetat, die Äthylacetatphasen mit 5 ml 0,1n-HCl 10 min. auf der Schüttelmaschine reextrahiert und die salzsaure Phase mit 2 ml Wasser in einen 10 ml Messkolben gespült, diazotiert und gekuppelt und bis zur Marke aufgefüllt. Die Extinktionen wurden nach 30 - 40 min. bei 550 nm ausgemessen.

D VIII Dünnschichtchromatographie (zu C III,4)

=====

1) Beschichtung der Platten

30 g Kieselgel GF 254 Merck wurden mit 60 ml Wasser angeschüttelt und auf 5 Platten (20 x 20 cm) in einer Schichtdicke von 1 mm aufgetragen. Die Platten wurden luftgetrocknet und konnten nach 24 Stunden verwendet werden.

2) Kammersättigung

Die Kammern wurden mit Filtrierpapier ausgelegt, mit 120 ml Fließmittel beschickt und 30 min. gesättigt.

3) Fließhöhe

Die Fließhöhe betrug 15 cm bei einer Laufzeit zwischen 20 und 45 min..

4) Detektion nach Rieder

a) Bratton-Marshall :

1. Besprühen mit 2n- H_2SO_4 , 30 sec. einwirken lassen

2. 5 min. in einer trockenen Kammer NO-Gasen

aussetzen (zu einigen g NaNO_2 in einem Schälchen 10 ml $2\text{n-H}_2\text{SO}_4$ zugeben)

3. Verblasen der NO-Gase im kalten Luftstrom und besprühen mit 0,4%-Kupplungsreagenz

b) Bratton-Marshall mit Hydrolyse :

Nach Besprühen mit $2\text{n-H}_2\text{SO}_4$ wurden die Platten 15 min. auf 130° im Trockenschrank erwärmt. Weiter wie bei a)

c) Bratton-Marshall mit Reduktion :

1. Besprühen mit einer frisch zubereiteten Natriumdithionit-Lösung (2g Natriumdithionit in 15 ml Wasser lösen, 2 ml Diäthylamin zugeben und mit Wasser auf 20 ml auffüllen)
2. Nach 3 min. im warmen Luftstrom trocknen
3. weiter wie bei a) 1.

D IX Extraktionsverfahren (zu C III,5)

Wenn keine besonderen Angaben gemacht wurden, erfolgte die Extraktion nach folgendem Schema :

Die wässrigen Untersuchungsproben wurden mit Na_2CO_3 -Lsg. auf pH 8-10 eingestellt und 10 min. auf der Schüttelmaschine mit dem halben Volumen Äthylacetat extrahiert und nötigenfalls 10 min. bei 5000 U/min. zentrifugiert. Die Äthylacetatphase wurde mit Wasser gewaschen und mit 0,1n-HCl 5 min. auf der Schüttelmaschine reextrahiert. Die salzsaure Phase wurde abgetrennt, mit Na_2CO_3 -Lsg. neutralisiert und mit dem gleichen Volumen Äthylacetat erneut 5 min. extrahiert. Diese zweite Äthylacetat-Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft (1. Phase der stärkeren Basen).

Die erste Äthylacetat-Phase (2. Phase der schwachen Basen) wurde anschliessend mit 10%-HCl 5 min. mechanisch geschüttelt. Die verbleibende Äthylacetat-Phase

wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeascht (2b. Phase der extrem schwachen Basen), während die salzsaure Phase wie oben neutralisiert, extrahiert und die organische Phase abgedampft wurde (2a. Phase der schwächeren Basen).

Erfüllt die Extraktion mit 10%-HCl, werden nur zwei Phasen gebildet : stärkere und schwache Basen. Wird die Untersuchungsprobe nur mit Äthylacetat extrahiert, befinden sich alle Modellsubstanzen in derselben Phase.

D X Verwendete Harnproben

1) Für die weiteren Untersuchungen wurden Harnproben von einer Versuchsperson herangezogen, die am 29.5. um 9⁰⁰ 10 Tabletten Mogidan^R à 5 mg (=50 mg (I)) eingenommen hatte.

Die Proben wurden am ersten Tag bis 24⁰⁰ alle 3 Stunden, dann einmal nach 6 Stunden und weiter alle 12 Stunden gesammelt (N 33 bis 40, N 47, N 48). Der Harn wurde längere Zeit (mehrere Monate) bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Harn :	N33	N34	N35	N36	N37	N38	N39	N40	N47	N48
Menge: (ml)	700	970	300	170	700	400	770	150	1000	330
Zeit :	29.5.	29.5.	29.5.	29.5.	29.5.	30.5.	30.5.	30.- 31.5.	31.5.	31.5.- 1.6.
	9- 12 ⁰⁰	12- 15 ⁰⁰	15- 18 ⁰⁰	18- 21 ⁰⁰	21- 24 ⁰⁰	0- 6 ⁰⁰	6- 18 ⁰⁰	18- 6 ⁰⁰	6- 18 ⁰⁰	18- 6 ⁰⁰

2) Um die Ergebnisse, die mit einem mehrere Monate bei Zimmertemperatur gelagerten Harn erhalten wurden, zu bestätigen und zu ergänzen, wurden die Untersuchungen an einem sofort extrahierten frischen Harn vorge-

nommen. Ein stark unruhiger Patient (Th.) erhielt am 14.8. 2 Tbl. Mogadan^R à 10 mg (= 20 mg (I)) und vom 15.-18.8. je 4 Tbl. Mogadan^R à 10 mg (= 40 mg (I)) täglich. Am 19.8. wurde die Medikation mit Mogadan^R wegen anhaltender Unruhe abgesetzt und mit Luminal fortgeführt. 24-Stunden-Harne wurden vom 17. bis 20.8. gesammelt (Th.1 bis 4).

Th.1 : 17.8. (1730 ml)

Th.2 : 18.8. (1950 ml)

Th.3 : 19.8. (1580 ml)

Th.4 : 20.8. (1100 ml)

D XI Papierchromatographie (zu C IV,1)

=====

Methode : absteigend

Papier : Schleicher und Schüll 2043b

Sättigung : 2 Stunden

Laufzeit : 16 Stunden

Temperatur : 18-20°

Detektion : entsprechend der Detektion bei der

Dünnschichtchromatographie

Fliessmittelsystem nach Jatzkewitz (120,121) :

n-Butanol/100%-HCOOH/Wasser = 120/10/70

Nach kräftigem Durchschütteln des Gemisches wurde das abgesetzte Wasser abgetrennt.

D XII Aufbereitung zur Herstellung von UV-Spektren

=====

1. UV-Spektren von II, III und VI

Um grössere Mengen zum Ausmessen von UV-Spektren, zu erhalten, wurden N 34 (240 ml), N 35 und 37 (insgesamt 250 ml) und N 38 bis 48 (insgesamt 1050 ml) quantitativ mit Äthylacetat extrahiert. Hierzu wurde für je 300 ml Harn mit 1 mal 100 ml und 2 mal 70 ml Äthylacetat je 10 min. mechanisch geschüttelt

und die organische Phase mit 2 mal 100 ml Wasser gewaschen. Die Äthylacetatphasen wurden im Vakuum auf etwa 50 ml eingeengt, mit 10%-HCl extrahiert und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat im Vakuum eingedampft (Phasen A). Nach Neutralisieren der salzsauren Phase wurde in Äthylacetat reextrahiert und erneut getrocknet und eingedampft (Phasen B). In den Phasen N 35/37 A war VI, in den Phasen N 38-48 B II und III für ein UV-Spektrum genügend angereichert.

Es wurde zunächst in Fl. 2 und 3 nach quantitativem Auftragen der Rückstände mit Methanol chromatographiert, die entsprechenden Zonen wurden abgeschabt, mit Methanol eluiert und erneut in Fl.1 chromatographiert. Die Substanzflecken in Höhe der RF-Werte von II, III und VI wurden abgeschabt, mit 2 ml Methanol warm eluiert, filtriert und das Spektrum im UV ausgemessen (Abb. 25-27).

Nach dem Ansprühen der restlichen Platte fand sich ein schwach Bratton-Marshall-positiver Substanzfleck in Höhe des Rf-Wertes von V, der jedoch keine eindeutige Identifizierung ermöglichte. Die Anwesenheit von V war bei dem angegebenen Reinigungsverfahren nicht auszuschliessen, da III und V bei Entwicklung mit Fl.3 nicht getrennt wurden und daher von der Platte zusammen abgeschabt worden sein konnten.

2) UV-Spektren von I und V

Es wurden etwa 3,5 l der Harne Th.1bis 4 bei pH 8-10 20 min. mit dem halben Volumen Äthylacetat mechanisch geschüttelt, die Äthylacetatphase 10 min. mit dem gleichen Volumen Wasser geschüttelt, mit einem Fünftel des Volumens 10%-HCl 2 mal je 10 min. reextrahiert und mit Natriumkarbonatlösung auf pH 8-10 gebracht. Es wurde erneut mit Äthylacetat 10 min.

extrahiert, mit Wasser gewaschen und die Äthylacetatphase mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum auf etwa 50 ml eingeengt. Nach Extraktion mit 0,1n-HCl wurde die Äthylacetatphase erneut getrocknet und im Vakuum eingedampft. Diese Phase enthielt die schwache Base I (vergl. Extraktionsverhalten Abb. 8). Die salzsaure Phase wurde neutralisiert und mit Äthylacetat reextrahiert. In dieser Phase befand sich die stärkere Base V. Zur Reinigung der Extrakte wurde zuerst in Fl. 1 dünn-schichtchromatographiert, die entsprechenden Flecken wurden abgeschabt, mit Methanol 3 mal eluiert und mit Fl. 4 erneut chromatographiert. Hier wurden die Substanzflecke in Höhe der Rf-Werte von I und V abgeschabt, mit 2,5 ml Methanol warm eluiert und die UV-Spektren aufgenommen. (Abb. 30 und 31)

D XIII Fermentative Aufarbeitung (zu C IV, 4)

=====

1. pH 4,6-Puffer (136)

23,1 ml 0,1n-HCl und 76,9 ml Natriumcitratlösung wurden gemischt. Zur Herstellung der Natriumcitratlösung wurden 20,008 g Zitronensäuremonohydrat in 200 ml 1n-NaOH gelöst und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

2. Arbeitsgang

Die Harnproben wurden dreimal bei pH 8-10 mit dem gleichen Volumen Äthylacetat je 10 min. mechanisch geschüttelt, mit Weinsäure schwach angesäuert und

(136) F.W. Küster, A. Thiel u. K. Fischbeck, Logarithmische Rechentafeln, 74.-83. Aufl., Walter de Gruyter-Verlag Berlin, 1958

mit 1/10 ihres Volumens Ketodase und ebenfalls 1/10 ihres Volumens pH 4,6-Puffer versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 48°C etwa 20 Stunden lang. Darauf wurde bei pH 8-10 mit Äthylacetat extrahiert, die Äthylacetatphase mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die Extraktückstände wurden in Methanol aufgenommen und dünnschichtchromatographiert.

E ZUSAMMENFASSUNG

=====

Die vorliegende Arbeit teilt sich in zwei Abschnitte auf :

Im ersten Teil wird die Analytik der 5-Phenyl-1,4-benzodiazepine untersucht, der zweite Teil befasst sich mit dem Metabolismus dieser Substanzen im Menschen.

Obwohl bereits zahlreiche Arbeiten über die Analytik einzelner Benzodiazepine erschienen waren, lagen nur wenig vergleichende Untersuchungen vor, die zu einem besseren Verständnis dieser Stoffklasse führen konnten.

Es wurden daher zunächst die aus der Literatur verfügbaren analytischen Daten durch eigene Untersuchungen ergänzt und in Monographien für Chlordiazepoxid, Diazepam, Nitrazepam und Oxazepam zusammengestellt.

Um ein quantitatives analytisches Verfahren bei wenig apparativem Aufwand zu erhalten, wurde eine Methode zur Titration im nichtwässrigen Medium ausgearbeitet. Hierbei wurden die Basizitäten der untersuchten Substanzen diskutiert. Als Lösungsmittel bei der potentiometrischen Endpunktbestimmung wurde Eisessig verwendet, bei der visuellen

Endpunktbestimmung mit Kristallviolett als Indikator Eisessig für Chlordiazepoxid und Diazepam und Essigsäureanhydrid für die schwächeren Basen Nitrazepam und Oxazepam. Die Methode wurde auf verschiedene Arzneimittelnzubereitungen angewendet.

Zur quantitativen Erfassung kleiner Mengen von Chlordiazepoxid, Nitrazepam und Oxazepam wurde eine spektrophotometrische Methode angegeben, bei der die nach salzsaurer Hydrolyse entstehenden 2-Amino-benzophenone nach Bratton-Marshall diazotiert und gekuppelt wurden. Die Faktoren, die die Farb-reaktion beeinflussten, wurden variiert, um die Nachweisgrenze durch optimale Extinktionswerte möglichst niedrig zu halten. Im Hinblick auf eine spätere Identifizierung von Benzodiazepinen und deren Metaboliten aus biologischem Material wurden die Extraktionsbedingungen systematisch untersucht.

Bei der Aufnahme von N.M.R.-Spektren der Benzodiazepine, der 2-Amino-benzophenone und einiger anderer Derivate ergab sich eine interessante Aufspaltung der C_3 -Methylenprotonen des Diazepams. Diese Aufspaltung kam durch genügend langsames Umklappen von zwei äquivalenten, wannenartigen Konformationen zustande und war aus sterischen Gründen durch die N_1 -Methylierung des Diazepams bedingt.

Im zweiten Teil der Arbeit befassten wir uns mit dem Metabolismus des Nitrazepams, der im Gegensatz zu den drei anderen Benzodiazepinen nur wenig untersucht war.

Zur Identifizierung der Ausscheidungsprodukte im Harn nach oraler Verabreichung von Nitrazepam (I) beim Menschen wurden folgende Metabolisierungsschritte angenommen : Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe, Acetylierung der entstandenen

Aminogruppe, Hydroxylierung in 3-Stellung und Hydrolyse zu 2-Amino-benzophenon-derivaten. Daraus liessen sich neben Nitrazepam (I) sechs Modells-substanzen ableiten (7-Amino- (II), 7-Acetamido (III), 3-Hydroxy- (IV), 7-Amino-3-hydroxy-derivat (V), 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI) und 2,5-Diamino-benzophenon (VII), von denen V und VII unseres Wissens noch nicht beschrieben waren. Die Substanzen wurden synthetisiert und ihr analytisches Verhalten an Hand von UV-Spektren, IR-Spektren und anderen Daten untersucht. Zur Isolierung aus biologischem Material dienten ein spezifisches Extraktionsschema, das die Modells-substanzen in drei Gruppen aufteilte, eine modifizierte Farbreaktion nach Bratton-Marshall und die Dünnschichtchromatographie mit mehreren Fließmittelsystemen.

In Übereinstimmung mit Rieder (42) wurden der 7-Amino- (II) und der 7-Acetamido-metabolit (III) als Hauptausscheidungsprodukte im Harn gefunden. Erst nach starker Konzentrierung gelang auch der Nachweis von unverändertem Nitrazepam (I) und von 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI). Oxydation in 3-Stellung wurde an Hand des 7-Amino-3-hydroxy-metaboliten (V) nachgewiesen. Eine Reihe von Abbauprodukten lag in Form von säurelabilen Konjugaten vor.

Damit waren am Beispiel des Nitrazepams die Metabolisierungsschritte Oxydation, Reduktion, Hydrolyse und Bindung zu polaren Konjugaten aufgefunden worden. Nach salzsaurer Hydrolyse der Harnproben liessen sich 2-Amino-5-nitro-benzophenon (VI) und 2,5-Diamino-benzophenon (VII) extrahieren und identifizieren. Diese Spaltprodukte bieten eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Nitrazepam im Harn.

Lebenslauf

Am 25.3.1942 wurde ich als Sohn des Apothekers Walter Sadée und seiner Ehefrau Elsa, geb. Pilger, in Bad Harzburg geboren.

Nach sechsjährigem Aufenthalt in Phöben bei Werder/Potsdam kam ich nach Berlin-Friedenau, wo ich bis heute wohne. Hier besuchte ich vier Jahre die Grundschule und wurde dann auf dem Steglitzer Gymnasium eingeschult. Dort bestand ich im Februar 1961 die Reifeprüfung.

Die Ausbildungszeit als Apothekerpraktikant leistete ich in der väterlichen Apotheke in Friedenau ab. Nach dem Vorexamen im März 1963 immatrikulierte ich mich an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich für das Fach Pharmazie, wechselte nach zwei Semestern zur Freien Universität Berlin und legte dort die Pharmazeutische Prüfung im Mai 1966 ab.

Seit dieser Zeit arbeite ich unter Anleitung von Herrn Prof. Schenck und Herrn Oberchemiker Dr. Beyer an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren :

Schwarzenbach (Anorg.Chem.)	ETH Zürich
Hardegger (Organ.Chem.)	"
Frey-Wyssling (Botanik)	"
Schenck, Eiden (Pharmazeutische Chemie)	FU Berlin
Hänsel (Pharmakognosie)	"
Schmidt (Hygiene und Bakteriologie)	"
Gauer (Physiologie)	"

